

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Casal Comendador

Directores

**Lucas Domínguez Rodríguez
Julio Álvarez Sánchez
Javier Bezos Garrido**

Madrid, 2016

TESIS DOCTORAL

Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral



Carmen Casal Comendador

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid

Servicio de Micobacterias

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense Madrid

Madrid, 2016



CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)
Servicio de Micobacterias

TESIS DOCTORAL

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN RUMIANTES Y CAMÉLIDOS: OPTIMIZACIÓN DE PRUEBAS DE BASE CELULAR Y HUMORAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EUROPEO
PRESENTADA POR

Carmen Casal Comendador

Bajo la dirección de los doctores:

Lucas Domínguez Rodríguez, Julio Álvarez Sánchez, Javier Bezos Garrido

Madrid, 2016



FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

D. Lucas Domínguez Rodríguez, Director del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense Madrid (UCM), D. Julio Álvarez Sánchez, Profesor asistente *Veterinary population medicine department, college of veterinary Medicine*, Universidad de Minnesota e investigador colaborador Centro VISAVET-UCM y D. Javier Bezos Garrido, Investigador postdoctoral MAEVA-SERVET S.L. e investigador colaborador Centro VISAVET-UCM,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título “**Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral**” ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. Carmen Casal Comendador en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor Europeo por la Universidad Complutense.

Fdo. Lucas Domínguez

Fdo. Julio Álvarez

Fdo. Javier Bezos

La realización la presente tesis doctoral ha sido posible gracias a:

Comunidad de Madrid



Proyecto Europeo FP7-KBBE-2007-212414

"Strategies for the eradication of bovine tuberculosis (TB-STEP)".



Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos



Laboratorio Europeo de Referencia de Tuberculosis Bovina
European Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (EU-RL).



EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY
FOR BOVINE TUBERCULOSIS
COMMISSION REGULATION (EC) No 737/2008

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a quienes habéis hecho posible esta tesis, porque aunque lleva mi nombre, no es mía, es de todos vosotros. Ha sido un proceso intenso, sobre todo en los últimos meses en los que me he visto superada por multitud de circunstancias y mi forma de ser lo ha hecho todo aún más complicado pero, a pesar de los pesares, habéis seguido acompañándome. Han sido años de muchas, muchas, muchas sonrisas, aprendizaje y momentos que nunca podré olvidar. De todos los sentimientos que me invaden ahora mismo quiero destacar dos, la felicidad por poder cerrar esta etapa y, sobre todo, la gratitud que siento.

Así que, aunque ya me tiembla la mano, comienzo por el principio, mis directores. En este caso el alumno no ha superado al maestro, lamento no haber estado a la altura de lo que esperabais. Este formato ha sido un gran reto, gracias por ayudarme y guiarme en este difícil camino, que finaliza en un enorme trabajo. Lucas, te agradezco tus ganas, ilusión y tu confianza en mí, demuestras tanta que suple la que a mí me falta. Gracias por ayudarme a madurar y a crecer. Tienes que entender que a veces nos cueste seguirte, eres un visionario, siempre vas por delante de todos y de todo. Julio, me vienen a la mente devoción, implicación y cariño. Más que director eres un amigo y sé bien la paciencia que has invertido en este aprendizaje. Gracias por esas charlas en tu escaso tiempo libre en las que me devolvías un poco del aire que me faltaba y por tus regañinas y comentarios. Siempre das una de cal y otra de arena, me has hecho reír llorando. Aunque finalmente de estadística no salga con amplios conocimientos, me has transmitido otros que creo que son más importantes, gracias de corazón. Javi, gran honor ser tu primera doctoranda. Gracias por haber sido tan valiente y por haber aguantado estoicamente ¡se acaba esta pesadilla! Desde el principio te tocó acogerme y enseñarme; gracias por haberlo hecho tan bien, creo que hemos logrado formar un buen equipo. Somos muy distintos y tu humor ácido me ha ayudado en algunas situaciones, y además me has arrancado alguna carcajada con tus correcciones. Gracias por todo, en especial por tu paciencia (sé que no es tu fuerte, mérito extra) y por el tiempo que te he robado en estos meses.

Mi grupo, el mejor equipo. A Bea y Manuel, compañeros de despacho en esta última etapa. Bea ¡la sonrisa más bonita de todo el laboratorio! Tu capacidad de aguante es impresionante, vales para un roto y un descosido (viva tu mami costurera), aunque mi ofuscación no me permitiera verlo sé que siempre has estado ahí. Manuel ¡además, vecino! Nos encontramos tarde pero fue intenso, has estado conmigo en momentos clave, gracias por hacer de juez y de verdugo y por tu espontánea genialidad. Lucía, das sentido a la frase “detrás de un gran hombre, hay una gran mujer”. Destacar tu enorme labor, eres un modelo profesional y contigo todo son retos de los que curten por dentro y por fuera. Gracias por tu dedicación y tu mano izquierda, siempre has tenido tu puerta abierta para mí. Fran, te debo mucho. Somos parecidos pero muy diferentes a la vez, ha sido un placer trabajar a tu lado. Nos debéis una visita a León. Niñas ¡cuánta guerra os he dado! Gracias por el trabajo y sobre todo por el día a día, que al final es lo que queda. Nuria, siempre dispuesta a regalar abrazos, últimamente puedo compartir más tiempo contigo ¡todo se puede! Taty, la más gamberra, en otoño ¡ya sabes! Johanna, eres una valiente ¡os va a ir fenomenal! Suerte en la nueva etapa. Alex, nos endulzas con tus estupendas recetas (aunque te cargas la operación biquini). Daniela, hemos coincidido poco, eres un encanto y siempre estas dispuesta a ayudar. Esther ¡bienvenida! Y mi Dori... por tu cariño incondicional, y por tu ayuda, haces que todo sea más fácil. Natalia, estás rodeada de gente maravillosa, confía en ellos, ánimo. Álvaro, gracias por ayudarme a ver todo más fácil, cuando lo necesites aquí estaré para echarte una mano.

También agradezco a Ana Mateos y Alicia Aranaz que desde el comienzo apostaron por mí. De León, no puedo ni quiero olvidarme del profesor Ferri, que me vio en el mundo científico desde que estaba en pañales, y a Maite Carbajo, que me puso en ruta y nunca ha dejado de animarme. También a Manuel Blasco, que ha seguido con interés y cariño mi trayectoria y a Ramón, siempre dispuesto al trabajo con una enorme sonrisa.

Al equipo de MAEVA SERVET. Alberto, aunque no estés en los papeles, te considero el cuarto director, de un modo u otro estás presente en todo este trabajo. Gracias por tanto, en especial por ser un solucionador de problemas nato. Hemos tomando pocas cañas y compartido muchas horas de viaje en las que me has dado lecciones de vida gratuitas, de esas que nunca sabes cuándo vas a necesitar. Siempre me sentiré en deuda contigo, GRACIAS. Marta, gracias por toda tu ayuda, parte de este trabajo no habría sido posible sin ella ¡nos veremos por el húmedo, prometido! Ana, quién me iba a decir que entre jaboneros, cabrillas, caracoles y habas enzapatás viviríamos tanto y tan intenso. Gracias por tu parte profesional, de la que me queda mucho por aprender y más aún por la personal, persona más práctica no he visto en mi vida y necesito mucho de eso.

Gracias a todos los grupos que formáis parte de esta familia visavetiana, da gusto trabajar con vosotros: ZTA, DICM, SAP, OMS, SEVEMUR, SEVISEQ, RRHH (Pilar y María, vuestra ayuda con las gestiones es infinita), Bioseguridad (nunca me cansaré de repetirlo, el P3 saca lo mejor y lo peor de uno mismo). Gracias a las lauras por la ayuda con las cobayas (Laura Delgado, todo corazón), David, cuídate esa espalda, y Pedro, siempre con palabras de ánimo. También a Soldene por su inestimable labor diaria. Y a los cachorros que trajisteis aire fresco: Sonia, Inés, Álvaro (gracias por todo tu cariño, no sabes cuánto se agradece), Diegu (solo una palabra: prado, gallegos y asturianos...), José Antonio, Lucas Lubillo, Luis, Elvira, e Irene. También a los visavetianos que dejaron su huella: Tania, te irá bien hagas lo que hagas, es cuestión de actitud y a ti te sobra. Sonia mucho ánimo que después de tiempos flojos siempre vienen cosas buenas. Sabri, muchas risas, muchas historias, en fin... MUCHO, cuando esto termine lo celebraremos como se merece. Laura Guijarro, aunque somos un desastre para organizarnos, siempre nos acordamos la una de la otra. Gordi, espero vernos pronto. Paola, toda la suerte del mundo. Leydis, que bien volver a tenerte cerquita. Michele, que la vuelta sea para mejor, cuídate mucho.

Y en especial a Tereso, no se me ocurre una compañera mejor de viaje para tantas y tantas horas, por esos abrazos forzados, y sobre todo por todo el tiempo de calidad que me has regalado. Marta, mi bdm in love, hemos crecido juntas y espero que así sigamos. Eres fuente de admiración, confío más en ti de lo que te reconozco, pero eso creo que ya lo sabes. Irene, apareces siempre en el momento oportuno, es un don que tienes. Cris, por cuidarme tanto y tan bien, fuera y dentro de VISAVET, eres un salvavidas. Mi rubialex, con permiso de Marta y de Jose, fuiste un flechazo, eres de lo mejor que he conocido nunca. Marisa, te debo unas cuantas, de estadística y de cosas más importantes. Vales más de lo que crees. Pilita, detallista al máximo, todo amor, gracias por estar siempre pendiente. Lomos, llevamos ya unos cuantos años juntos y revueltos, tu forma de ver la vida es original, gracias por contagiarla. Maza, no he conocido a nadie más auténtica que tú, eres la mejor compañera de bodas, bautizos, comuniones y vinos de VISAVET. Adri, espero que nos queden muchos festivales. Marga, simplemente THE BEST. Ana García ¡por esas cañitas de los cursos! gracias por cogerme la mano en el avión. María Ugarte, gracias por tus ánimos y tu ayuda con las gestiones. Nerea, todo dulzura y sabios consejos. Joaquín, siempre has sacado tiempo y una sonrisa para mí. Vero, cuantas charlas para arreglar nuestros caóticos mundos, gracias por todo tu apoyo y tu cariño, me ayudas a ver las cosas de otro color (sigue pendiente una visita a tu casa). A mis pimpinela particulares: Carmen, por esas pocas collejas que me has

dado y porque siempre recordaré el día del escondite por Madrid. Te preocupas más de los demás que de ti misma, hay poca gente que tenga ese corazón tuyo. Antonio, siempre has tenido palabras de apoyo, y lo que es más importante, me has ayudado en todo lo que te he pedido... y lo que no.

Mención aparte al grupo de SIC, se la merecen porque los ordenadores y yo... mal asunto. Deberían daros un plus por vuestra paciencia. Javi, por esos skypes mañaneros, Carlos, por tu humor siempre oportuno, Edu, por tu ayuda con la caótica ORDER DB y Sergio, co-autor de esta tesis, gracias en especial por tu ayuda con la maquetación. Eres una criatura extraña a la par que adorable. Gracias por tu forma de ser y por esos bailoteos, espero que queden muchos (aunque me corte el pelo).

Quería también poner de manifiesto mi agradecimiento a Manuela (Vicedecana de Posgrado y Ordenación Académica), Anabel (responsable de Doctorado del Departamento de Sanidad Animal), Reyes (secretaría del Departamento de Sanidad Animal), y María José Muelas (secretaría de la Facultad de Veterinaria) ya que si este proceso investigador es en sí tedioso, las gestiones administrativas tienen lo suyo; gracias a todas.

Al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), y en especial a Lucio Carbajo y a José Luis Sáez. A las autoridades de las distintas comunidades autónomas por facilitar el trabajo, en especial a Jesús Carpintero, Rosa Díaz y Enrique Pagés de la Comunidad de Madrid. Olga Mínguez, Sergio Marqués, Ana Grau y Olegario Martín, de la Junta de Castilla y León. Alberto Pacios de la Junta de Andalucía. Tirso Yuste, Marta Vigo y Jesús Alonso, de la Consejería de Agricultura de Castilla-la Mancha, y Cristina Sanz y Lucía Galán del Servicio de Sanidad Animal del gobierno de Extremadura.

Gracias de corazón a todos los animales que sin saberlo han aportado su granito de arena en este trabajo, colaborando más incondicional y desinteresadamente que nadie; sin ellos nada de esto sería posible. A cada uno en distinta manera le he cogido cariño. También a los ganaderos que han colaborado con nosotros (con algunos nos hemos sentido casi como en casa) y a todos los “mozos” que nos han ayudado (mención especial a Ito) y han garantizado nuestra seguridad en todo tipo de situaciones. También al personal de las distintas explotaciones, oficinas comarcales y laboratorios con los que hemos tenido la suerte de haber colaborado: Julio (AVEGALI), Inmaculada y Luis de Trigueros, Antonio de Torrijos. Antonio y Fernando de la OCA de la Palma (Huelva), Miguel Ángel y Ángel del laboratorio regional de Sevilla. Agradezco también al personal de todos los mataderos que nos han facilitado la toma de muestras para los distintos estudios (Matajo, Madrid Norte, Matadero del Sur, y otros tantos).

Me siento agradecida a la gente que me ha enseñado y me ha tratado fenomenal visitando otras entidades: CZ Veterinaria, (Isabel y Blanca) y Santa Fe (Tina, Fulgencio y Satur). También al personal del Carlos III, en especial a Merche y a Inma. Y a todos los integrantes del IREC y de NEIKER ¡siempre que nos vemos nos pegamos unas buenas palizas! Es un gustazo trabajar con gente tan maja y tan curranta.

Le agradezco a Montse Gutiérrez, a Jose María Lozano y a Karely su apoyo y cariño durante mi estancia en Irlanda. To Kevin Kenny and John Egan at Backweston campus. Thank you for making the collaboration between our laboratories possible. Kevin, thanks specially for your support and for keeping a smile on my face. Also, I am thankful to Colm for all the wonderful trips to Longtown.

Thanks to all the collaborators of European projects and NRLs members. Thanks in particular to Maria Laura Boschioli, Eammon Gormley, Douwe Bakker, and Martin Vordemeier, it was a great pleasure to work with you and enjoy the meetings. Also, thanks to John Clarke, Clare Whelan, Shelley Rhodes and John Lawrence, for all the help and support.

Escribiendo estas líneas me doy cuenta de que soy sumamente afortunada, por estar rodeada de gente que hace magia y que me habéis aguantado y aguantáis carros y carretas, estos tiempos no están siendo los mejores para mí, gracias por seguir a mi lado. Hay personas que se te van quedando en el camino pero parte de lo que soy es también por ellos. More y Elena, algún día espero recuperar el tiempo perdido; a mi grupo de la Uni (Sarita, Leti, Judith, Mon, Sil), los años de León marcaron y mucho y a mis compañeros Erasmus, gracias por todo lo vivido. Y para aquellos a los que guardo un cariño especial: Carmen Veteri, Brianda, Xavi, Cris Cai, Merys y Beina. También al equipo de profesionales de YGEA, en especial a Javi. Gracias por cuidarnos tan bien, a mi espalda y a mí, y por tu frase “esto también pasará”, tabla de salvación en los últimos meses.

De mis inicios en el INIA, me llevo lo mejor de lo mejor. A mi Clemente, afrontas la vida con una sonrisa. Celia ¡ya estas tardando en volver!. Ánimo que queda nada, ¡vamos a ir juntas hasta el final! Gracias por vuestros sabios consejos de hermanas mayores.

A mis sanchas... gracias por dejarme formar parte de vuestra familia, a pesar de que era enemiga declarada. Clara, vuelve ya y más ahora que nos haces un poco tías. A ver si las otras dos siguen tu ejemplo. Virus, simplemente, sabes ser sol cuando la vida esta nublada, siempre consigues sacarme una sonrisa, gracias de corazón. Carmen, gracias por apoyarme tanto. Últimamente no tienes buenas cartas, pero siempre tendré un as en la manga para ti.

A mis isidoros... gracias por dejar que me colara en esos chiqueros, en novatadas y en esas fiestas. Moyoyo, sufriendo conmigo y alegrándote por mí a cada paso, GRACIAS por tu cariño, tu ánimo y apoyo, siempre, pero en especial en estas últimas etapas, tienes un corazón enorme. Menina antes de encontrarnos ya nos conocíamos, que nunca se pierda “el factor gallegas” ése que nadie entiende, solo nosotras (y a veces... depende...). Chou compañera de festivales y muchas otras cosas, te mereces sonreír siempre, no lo olvides. Anita, por fin has encontrado tu sitio ¡me alegro mucho! Vagis, espero que nos sigas regalando momentazos por mucho tiempo, y Toñi, “socia”, eres espectacular ¡ánimo con tu nueva etapa! A los niños (Rubén, Saviola y Cuñao), por formar parte de esta familia que creamos en Madrid. También a Gargo, toda la suerte del mundo. Y a mi Fre... hermana, psicóloga, ángel y demonio, personal assistant&shopper y mucho más. Por ayudarme a preparar mil charlas (¡esas técnicas con nombre de mujer que tanto te gustan!), por esos tuppers, por esos viajes diarios, por esas resacas, por esas sesiones de sofing, por esos paseos, esos espectáculos chichinabescos... y por tanto... sin ti no lo habría logrado. Desde tu mentalidad ingenieresca tratas de frenar a mi visceralidad, y aprendo de ti constantemente. Me has ayudado en mi etapa personal y profesional más dura, sé que no he sido fácil. Gracias, de corazón.

Y a todos los que en algún momento formasteis parte de la casa ocupa. Daniela, eres de esas personas que entran en tu vida de puntillas y se hacen hueco sin que te des cuenta. Merce, aportas el toque de dulzura e inocencia que nos da la vida. Brenda, por suerte o por desgracia, nos está costando la distancia, pero confío en que todo acabe saliendo bien. Alvalín (si no lo pongo, reviento!) gracias por cuidarnos de día, y especialmente de noche. Migue, mi yo en chico. Eres especial, hagas lo que hagas siempre te irá bien. Marco, que nos queden por lo menos otros 100 años por disfrutar. Pequerrecha, a pesar de la distancia nos tenemos muy presentes la una a la otra. Mari, me recuerdas cual es mi lugar y lo que valgo, gracias por

tu cabeza siempre bien amueblada y por ayudarme a poner en orden mi vida, GRACIAS. Nane se casa ¡lolololololol! Gracias por ser mi mejor guía en la tierra del páramo, por todo tu cariño, y por estar siempre al pie del cañón. A mis anclados, Asieer, tuvimos la suerte de conocernos dos veces, la siguiente tesis es la tuya... ¡a por ella! Mana, sigo acordándome de ti cada día. No conozco a nadie que transmita tanto buen rollo como tú. Con lo pequeña que eres te creces en las circunstancias. Gracias por tanto... en especial por la casa ocupa (siempre nos quedará la T4). Geller, no querías ser mi amiga pero me dio igual. Eres mucho más valiente de lo que crees. A veces me da miedo lo mucho que me conoces, pero es genial porque no hace falta que te diga nada para que me entiendas, y eso no pasa con todo el mundo. Gracias también al recién llegado Danonio... ¡ten amigas para esto!

A mi familia política, que siempre me ha tratado como una más, en especial a Rosa y Joaquín, Javier y Sefi. Gracias de corazón por vuestro apoyo y cariño incondicionales. También a todos los del páramo que me habéis acogido con ganas, sobre todo Pili y Fran, Rosana y Jose Angel, Raquel y Ramón, Nano y Emilia. Y a mis mamis en Madrid: mis tías Matilde (una carnal y la otra “adoptiva”).

Jose, mi más bonita “casualidad” (gracias Carmen). Gracias por ser y estar y aguantarme contra viento y marea, siento haber sido tan odiosa en los últimos meses. Lo nuestro nunca fue un cuento de hadas, pero ya nos merecemos un final feliz, ése por el que llevamos luchando unos años. Como dice una canción, creía que el equilibrio es imposible, pero a base de constancia hemos logrado formar nuestro mundo, casi sin querer queriendo. Si me dejas, será un placer disfrutar el resto de mi vida contigo.

A mis hermanos Rocío y Ángel, os quiero con locura, gracias por vuestro cariño y apoyo incondicional, aunque siempre he sido la “rarita” de la familia. A mis cuñados, Carlos, Mir, David y Aida. No os elegí, fue la vida la que os puso en mi camino, yo no lo habría hecho mejor. Gracias por todo, en especial por regalarme a Antón, Anna, Tomás (y los que vengan), que son lo más. Cuando estoy con ellos se detiene el tiempo, son mi mejor terapia.

Y... a mis padres, los mejores. Tengo que confesar que en los momentos en los que creí que no podría lograrlo fuisteis vosotros por los que decidí continuar. Más que de nadie, esta tesis es vuestra, la habéis sufrido tanto o más que yo y espero que os sintáis un poquito orgullosos de ella. Mamá, siento haber sido tan injusta, y papá, gracias por haber sido tan paciente, te prometo que el viaje a Irlanda llegará. Haga lo que haga, siempre estáis ahí. Me habéis transmitido todo lo que soy, y los valores que trato de respetar a diario, intentando convertirme en mejor persona. Habéis estado conmigo en los cursos, en el campo, en el laboratorio, en el p3, en Irlanda, en las charlas, en las horas de trabajo infinitas, en los congresos... allá donde voy me acompañáis. Nunca os podré agradecer lo suficiente.

A todos los que habéis formado parte de esto, de formas muy distintas, de nuevo, gracias.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1. TUBERCULOSIS: DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA | 5 |
| 1.1.1. Género <i>Mycobacterium</i> | 6 |
| 1.1.1.1. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : características antigénicas | 8 |
| 1.1.1.2. <i>Mycobacterium bovis</i> | 11 |
| 1.1.1.3. <i>Mycobacterium caprae</i> | 13 |
| 1.1.2. Tuberculosis en animales | 14 |
| 1.1.2.1. Tuberculosis en rumiantes | 16 |
| 1.1.2.1.1. Situación actual de la tuberculosis bovina en Europa | 18 |
| 1.1.2.1.2. Tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas) | 22 |
| 1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA TUBERCULOSIS | 23 |
| 1.2.1. Patogénesis de la tuberculosis en ganado bovino | 24 |
| 1.2.2. Respuesta inmune innata | 27 |
| 1.2.3. Respuesta inmune adquirida | 31 |
| 1.2.3.1. Respuesta inmune de base celular | 32 |
| 1.2.3.2. Respuesta inmune de base humoral | 33 |
| 1.2.4. Evolución del estatus del hospedador tras la infección | 34 |
| 1.2.5. Vacunación como estrategia para el control de la tuberculosis bovina | 37 |
| 1.2.5.1. Vacuna <i>M. bovis</i> BCG | 38 |
| 1.2.5.2. Vacunas alternativas a <i>M. bovis</i> BCG | 40 |
| 1.3. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN RUMIANTES Y CAMÉLIDOS DE SUDAMÉRICA | 42 |
| 1.3.1. Métodos para la evaluación de pruebas diagnósticas | 42 |
| 1.3.2. Pruebas diagnósticas basadas en la detección de la respuesta inmune | 44 |
| 1.3.2.1. Pruebas diagnósticas para la detección de la respuesta inmune de base celular | 44 |
| 1.3.2.1.1. Intradermotuberculinización (IDTB) | 44 |
| 1.3.2.1.1.1. Rendimiento de la IDTB en rumiantes y camélidos de Sudamérica | 56 |
| 1.3.2.1.2. Test de detección de interferón-gamma (IFN- γ) | 61 |
| 1.3.2.1.2.1. Rendimiento del test de detección de IFN- γ en rumiantes y camélidos de Sudamérica | 66 |
| 1.3.2.2. Pruebas diagnósticas para la detección de la respuesta inmune de base humoral | 69 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.3.2.2.1. Rendimiento de las pruebas serológicas en rumiantes y camélidos de Sudamérica | 71 |
| 1.3.3. Pruebas diagnósticas basadas en la detección del agente | 74 |
| 1.3.3.1. Diagnóstico microscópico | 74 |
| 1.3.3.2. Diagnóstico macroscópico | 75 |
| 1.3.3.3. Diagnóstico histológico | 75 |
| 1.3.3.4. Diagnóstico microbiológico | 76 |
| 1.3.3.5. Diagnóstico mediante PCR directa [<i>Real time</i> -PCR (RT-PCR)] | 78 |
| 1.4. FACTORES QUE INTERFIEREN EN EL DESARROLLO Y/O EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD EN ANIMALES | 79 |
| 1.4.1. Factores relacionados con el hospedador | 79 |
| 1.4.2. Factores no relacionados con el hospedador | 85 |
| 2. OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS / OBJECTIVES AND ORGANISATION OF THE THESIS | 97 |
| 3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES | 105 |
| 3.1. CAPÍTULO I. OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE BASE CELULAR ACTUALMENTE EN USO (IDTB Y TEST DE DETECCIÓN DE IFN- γ) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN RUMIANTES (GANADO BOVINO Y CAPRINO) | 105 |
| 3.1.1. Primer estudio experimental: efecto de la posición en el resultado de la IDTB en ganado bovino libre e infectado de forma natural | 106 |
| 3.1.1.1. Material y métodos | 106 |
| 3.1.1.2. Resultados | 111 |
| 3.1.1.3. Resumen | 116 |
| 3.1.2. Segundo estudio experimental: efecto del criterio de interpretación establecido en el resultado del test de detección de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino procedentes de explotaciones libres e infectadas de forma natural | 117 |
| 3.1.2.1. Material y métodos | 117 |
| 3.1.2.2. Resultados | 121 |
| 3.1.2.3. Resumen | 129 |
| 3.1.3. Tercer estudio experimental: comparación de varios kits comerciales en el resultado del test de detección de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino procedentes de explotaciones infectadas de forma natural | 129 |
| 3.1.3.1. Material y métodos | 129 |
| 3.1.3.2. Resultados | 134 |
| 3.1.3.3. Resumen | 140 |
| 3.2. CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE UNA NUEVA VACUNA FRENTE A LA TUBERCULOSIS HUMANA (<i>M. TUBERCULOSIS</i> SO2) EN GANADO CAPRINO | 142 |
| 3.2.1. Cuarto estudio experimental: interferencia producida con la vacuna <i>M. tuberculosis</i> SO2 en el diagnóstico de tuberculosis en ganado caprino | 143 |
| 3.2.1.1. Material y métodos | 143 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.1.2. Resultados..... | 146 |
| 3.2.1.3. Resumen..... | 151 |
| 3.3. CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD A LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Y DE LAS LESIONES DESARROLLADAS EN GANADO CAPRINO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON DISTINTAS ESPECIES DEL MTBC..... | 153 |
| 3.3.1. Quinto estudio experimental: respuesta a la IDTB y al test de detección de IFN- γ y valoración del cuadro de lesiones desarrollado en ganado caprino infectado de forma experimental con tres especies del MTBC..... | 154 |
| 3.3.1.1. Material y métodos | 154 |
| 3.3.1.2. Resultados..... | 158 |
| 3.3.1.3. Resumen..... | 163 |
| 3.4. CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE TUBERCULOSIS EN CAMÉLIDOS DE SUDAMÉRICA (LLAMAS Y ALPACAS)..... | 164 |
| 3.4.1. Sexto estudio experimental: sensibilidad de la IDTB con distintos protocolos y de un ELISA experimental en alpacas infectadas de forma natural | 165 |
| 3.4.1.1. Material y métodos | 165 |
| 3.4.1.2. Resultados..... | 170 |
| 3.4.1.3. Resumen..... | 177 |
| 3.4.2. Séptimo estudio experimental: especificidad de la IDTB con distintos protocolos y de un ELISA experimental en llamas y alpacas libres de tuberculosis en su hábitat natural..... | 178 |
| 3.4.2.1. Material y métodos | 179 |
| 3.4.2.2. Resultados..... | 181 |
| 3.4.2.3. Resumen..... | 185 |
| 4. DISCUSIÓN | 187 |
| 4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA IDTB Y DEL TEST DE DETECCIÓN DE IFN- γ | 187 |
| 4.2. INTERFERENCIA DE LA VACUNA <i>M. tuberculosis</i> SO2 EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN GANADO CAPRINO | 197 |
| 4.3. REACTIVIDAD FRENTE A LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS Y DESARROLLO DE LESIONES EN GANADO CAPRINO INFECTADO DE FORMA EXPERIMENTAL CON <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> Y <i>M. tuberculosis</i> | 203 |
| 4.4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA IDTB Y UN ELISA EXPERIMENTAL EN LLAMAS Y ALPACAS..... | 207 |
| CONCLUSIONES..... | 217 |
| CONCLUSIONS..... | 219 |
| SUMMARY EXTENDED VERSION..... | 221 |
| REFERENCIAS..... | 225 |
| ANEXOS | 267 |
| Anexo I. Interpretación de las pruebas diagnósticas de base celular incluidas en los distintos estudios experimentales. | 267 |
| Anexo II. Lista de abreviaturas | 269 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Anexo III. Lista de figuras..... | 271 |
| Anexo IV. Lista de tablas..... | 273 |
| Anexo V. Escala para la valoración del cuadro de lesiones (quinto estudio experimental)..... | 276 |
| Anexo VI. Artículos científicos derivados del trabajo realizado para la presente tesis doctoral..... | 277 |

RESUMEN

La tuberculosis es una zoonosis bacteriana que representa un importante problema sanitario en el hombre y los animales (domésticos y silvestres), siendo en estos *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* las especies de mayor relevancia. La enfermedad tiene un gran impacto económico ya que produce un descenso de la producción de los animales y restricciones en su movimiento, además de los costes derivados de su erradicación en el ganado bovino. Actualmente, la tuberculosis en otras especies domésticas como la cabra, comienza a tener relevancia en aquellos países con elevado censo de caprino. Por otra parte, los camélidos de Sudamérica (alpacas y llamas principalmente), se emplean cada vez con mayor frecuencia fuera de su hábitat natural como mascotas y para la producción de fibra. Además, son altamente susceptibles a la enfermedad, habiéndose notificado varios brotes de tuberculosis en estos animales en Europa. Los programas de erradicación se basan en una estrategia de “diagnóstico y sacrificio”, de tal modo que los animales positivos a las pruebas diagnósticas se eliminan de la explotación. Las técnicas diagnósticas oficiales en la Unión Europea son la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) y el test de detección de interferón-gamma (IFN- γ), que detectan la respuesta inmune de base celular. Existen, además, pruebas para la detección de anticuerpos, algunas disponibles comercialmente y otras en fase experimental. Con el objetivo de optimizar el diagnóstico de la tuberculosis en rumiantes (ganado bovino y caprino) y en camélidos (llamas y alpacas), se han realizado siete estudios experimentales, distribuidos en cuatro capítulos, diseñados para cumplir los cuatro objetivos de la presente tesis doctoral.

El capítulo I comprende tres estudios desarrollados para optimizar el rendimiento de las pruebas actualmente en uso para el diagnóstico de la tuberculosis en rumiantes. El primer estudio experimental evaluó el efecto de la posición en la que se inocula la PPD bovina en el resultado de la IDTB, en ganado bovino libre e infectado de forma natural. En ausencia de infección la IDTB no se vio afectada por la localización donde se realizó la prueba, sin embargo, en presencia de infección, la inoculación de la PPD bovina en la zona cervical anterior incrementó la probabilidad de obtener una respuesta positiva a la IDTB. El segundo estudio experimental de este capítulo se realizó para valorar el efecto del criterio de interpretación aplicado en el resultado del test de detección de IFN- γ realizado con el kit Bovigam, empleando muestras de ganado bovino libre e infectado de forma natural. Se observaron diferencias significativas tanto en la especificidad, como en la sensibilidad alcanzadas en función del criterio de interpretación aplicado. En el tercer estudio experimental, último del capítulo I, se comparó el resultado de varias pruebas comerciales para la detección

de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino infectado de forma natural. En función del fabricante existieron diferencias significativas en la proporción de animales detectados.

El capítulo II incluye el cuarto estudio experimental de la presente tesis doctoral, diseñado para evaluar la interferencia producida con la vacuna *M. tuberculosis* SO2 en el diagnóstico de tuberculosis en cabras, empleando las PPDs y formulaciones antigénicas alternativas empleadas para diferenciar animales infectados de aquellos vacunados con *M. bovis* BCG. La especificidad de las pruebas de base celular alcanzó hasta el 100% empleando las formulaciones antigénicas.

El capítulo III de esta tesis tiene como objetivo estudiar la respuesta a las pruebas diagnósticas y las lesiones desarrolladas en ganado caprino infectado experimentalmente con distintas especies del MTBC. Para ello se llevó a cabo un quinto estudio experimental que analizó la respuesta a la IDTB y al test de detección de IFN- γ y valoró el cuadro de lesiones desarrollado en ganado caprino infectado con *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*. La especie del MTBC fue determinante para la evolución de la infección, el rendimiento de las pruebas diagnósticas, así como para la severidad de las lesiones desarrolladas en el hospedador.

El capítulo IV, último de esta tesis doctoral, comprende dos estudios para analizar la sensibilidad y la especificidad de la IDTB (simple y comparada) y de una prueba serológica experimental para el diagnóstico de tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas). El sexto estudio experimental se realizó en alpacas infectadas de forma natural, al emplear la IDTB simple se alcanzó una mayor sensibilidad que con la prueba comparada, independientemente de la localización evaluada. Sin embargo, esta fue superior efectuando la lectura de la IDTB 72 horas después de la inoculación de las PPDs. La sensibilidad obtenida con la prueba experimental fue superior cuando se realizó con muestras recogidas 15 días tras la IDTB, confirmando la existencia de un efecto *booster*. El séptimo estudio experimental (último trabajo de la presente tesis doctoral), se desarrolló en Perú, en llamas y alpacas libres de tuberculosis. La IDTB comparada fue más específica que la simple, independientemente de la dosis de PPD (2.500 IU frente a 5.000 IU), la localización y del momento de la lectura. La especificidad de la serología fue superior cuando esta se realizó con muestras obtenidas antes de la IDTB, además, el empleo en serie de las dos pruebas evaluadas incrementó la especificidad alcanzada con cada prueba por separado.

SUMMARY

Tuberculosis is a bacterial zoonosis that represents an important health problem in humans, domestic animals and wildlife. The most frequently involved species in animal tuberculosis are *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*. The disease has a major economic impact caused by the decreased production in animals, the commercial restrictions implied, and the costs of eradication campaigns in cattle. In the last years, tuberculosis is gaining relevance in other domestic species i.e. goats, mainly in those countries with a high census of this species. Additionally, tuberculosis in South American camelids is increasingly gaining importance in recent years, llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) are main species imported into the European Union. Eradication campaigns are based on "test-and-slaughter" strategies which implies the removal of animals that react positively to diagnostic tests. The official diagnostic tests approved in the European Union are the single intradermal tuberculin (SIT) test and the interferon-gamma (IFN- γ) assay, which detect the cell-mediated immune response to the pathogen. Serological assays for the detection of antibodies are also available, commercially and/or experimentally. Despite of the efforts performed for the control and the eradication of the disease, in some areas it is not possible to decrease the prevalence due among others, to the limitations present in the official diagnostic techniques. Therefore, in order to optimize the diagnosis of tuberculosis in ruminants (cattle and goats) and camelids (llamas and alpacas), nine experimental studies divided into five chapters have been performed, each chapter has been designed to achieve the five objectives of this thesis.

Chapter I includes three studies developed for optimizing the performance of the tests currently in use for the diagnosis of tuberculosis in ruminants. The first experimental study was designed to evaluate the effect of the site of inoculation of the bovine PPD on the outcome of the SIT test in OTF and naturally infected cattle. In the absence of infection, the SIT test was not affected by the location of the PPD inoculation, however, in infected animals, the inoculation of bovine PPD in the cervical anterior area increased the probability to obtain a positive result to the SIT test. The second experimental study of this chapter was conducted with the aim to assess the effect of the interpretation criteria applied on the result of the IFN- γ assay performed using the Bovigam kit, on samples collected from OTF and naturally infected cattle. Significant differences in both specificity and sensitivity were recorded according to the interpretation criteria applied. The third experimental study (last work from chapter I), was performed to compare the result of three commercial kits for the detection of IFN- γ assay on samples from naturally infected cattle. Significant differences in the number of animals detected as positive were observed depending on the commercial kit selected.

Chapter II includes the fourth experimental study of this thesis, designed to evaluate the possible interference of *M. tuberculosis* SO2 vaccine in the diagnosis of tuberculosis in goats. The SIT test and the IFN- γ assay were performed with PPDs and alternative antigenic formulations in the same manner as for differentiation of infected animals from those vaccinated with *M. bovis* BCG. The specificity of the tests that detect the cell-mediated immune response reached 100% with the antigen formulations.

Chapter III of this thesis aims to study the response to diagnostic tests and the lesions developed in goats experimentally infected with different species of the MTBC. With this purpose, the fifth experimental study was conducted, in order to evaluate the response to the SIT test and the IFN- γ assay and to assess the lesions developed in goats experimentally infected with *M. bovis*, *M. tuberculosis* and *M. caprae*. The course of the infection, the performance of diagnostic tests and the severity of the lesions developed were greatly dependent on the MTBC species involved.

The final chapter (chapter IV) of the present thesis, includes two studies that evaluate the sensitivity and specificity of the SIT test (single and comparative) and an experimental serological assay for the diagnosis of tuberculosis in South American camelids (llamas and alpacas). The sixth experimental study aimed to assess the sensitivity of the tests and was performed in naturally infected alpacas, the single SIT test showed higher sensitivity, regardless of the site of inoculation of the PPDs. Moreover, the sensitivity was higher when the reading was performed 72 hours after the inoculation of the PPDs. The sensitivity obtained with the serological experimental assay was higher when the assay was performed on samples collected 15 days after the SIT test, confirming the existence of a booster effect. The seventh experimental study (last work of this thesis), aimed to assess the specificity of the tests and was performed in Perú, on llamas and alpacas free of tuberculosis. The comparative SIT test was more specific than the single one, regardless of the dose, the site of inoculation of PPD, and the time of reading. The specificity of the experimental serological assay was higher when it was performed with samples collected before the SIT test, furthermore the serial interpretation of the results of both techniques resulted in increased specificity when compared to the one recorded for each test separately.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TUBERCULOSIS: DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa consuntiva y de curso crónico causada por micobacterias incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que presenta distribución mundial [Organización Mundial de la Sanidad Animal (*Office International des Epizooties*: OIE), 2009] y que afecta al ser humano y a los animales domésticos (Pesciaroli *et al.*, 2014) y silvestres (Palmer, 2013). Su control compete tanto a la Sanidad Animal como a la Salud Pública debido al carácter zoonótico que posee, ya que puede transmitirse entre los animales y el hombre (Haydon *et al.*, 2002). El nombre de la enfermedad se debe a que las lesiones que produce en los órganos y linfonodos afectados presentan aspecto de tubérculo, siendo característica la aparición del denominado granuloma tuberculoso (Davis & Ramakrishnan, 2009).

El MTBC incluye a todas las especies de micobacterias causantes de la enfermedad, habiéndose observado cierta preferencia patógeno–hospedador. En la Tabla 1 se recogen las especies incluidas en el MTBC hasta la fecha, así como su hospedador más frecuente (no el único ya que la especificidad de hospedador es relativa y todos los miembros incluidos en el MTBC pueden ser potencialmente patógenos para otras especies).

Tabla 1. Especies incluidas en el MTBC y su principal hospedador.

| Especie | Hospedador |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> (Koch, 1982) | Humanos |
| <i>M. microti</i> (Reed, 1957) | Roedores |
| Variante genética <i>Dassie bacillus</i> (Wagner <i>et al.</i> , 1958) | Damán roquero |
| <i>M. africanum</i> (Castets & Sarrazat, 1969a); (Castets <i>et al.</i> , 1969b) | Humanos y primates |
| <i>M. bovis</i> (Karlson & Lessel, 1970) | Bovinos |
| Variante genética <i>Oryx bacillus</i> (Lomme <i>et al.</i> , 1976); (van Ingen <i>et al.</i> , 2012) | Órice |
| <i>M. bovis</i> BCG (bacilo Calmette-Guérin) (Grange <i>et al.</i> , 1983) | Cepa vacunal |
| <i>M. canettii</i> (van Soolingen <i>et al.</i> , 1997) | Humanos |
| <i>M. caprae</i> (Aranaz <i>et al.</i> , 2003) | Caprinos |
| <i>M. pinnipedii</i> (Cousins <i>et al.</i> , 2003) | Pinnípedos |
| <i>M. mungi</i> (Alexander <i>et al.</i> , 2010)* | Mangosta |
| <i>M. suricattae</i> (Parsons <i>et al.</i> , 2013)* | Suricato |

*Especies propuestas para ser incluidas en el MTBC. Fuente: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>. Consultada el 20 de Octubre de 2015.

A pesar de que el MTBC engloba multitud de especies potencialmente patógenas para el hombre, el principal agente etiológico de la tuberculosis en el ser humano es *M. tuberculosis* (*sensu stricto*). Se estima que *M. tuberculosis* es responsable del 99% de todos los casos de tuberculosis en humanos y que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada, causando dos millones de muertes anuales [datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015]. En los animales se ha demostrado que la susceptibilidad a *M.*

tuberculosis es relativamente alta en primates y cobayas (LoBue *et al.*, 2010). Aparte de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. caprae* son las dos especies del MTBC que, a pesar de no tener al ser humano como principal hospedador, se consideran importantes agentes patógenos para el hombre (Dürr *et al.*, 2013).

1.1.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* (Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*, 2005) incluye más de 120 especies entre las que se encuentran bacterias saprófitas, patógenos oportunistas y patógenos estrictos del hombre y los animales, tanto homeotermos como poiquilotermos (Grange, 2001, Palmer, 2007a, Pollock & Neill, 2002, Schiller *et al.*, 2010b). Las especies patógenas más relevantes de este género son las que producen la tuberculosis (aquellas incluidas en el MTBC) y la lepra (*M. leprae*). Las principales características de las micobacterias son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno para su crecimiento, la inmovilidad, la imposibilidad de formar esporas y la ácido-alcohol resistencia. Se clasifican como Gram positivas aunque desde un punto de vista estricto no retienen el colorante violeta de genciana (realmente el colorante no llega a penetrar, debido a que su pared es fuertemente hidrófoba). El ácido desoxirribonucleico (ADN) de las bacterias de este género se caracteriza por presentar un contenido elevado de bases G+C que oscila entre el 61 y el 70% (Sreevatsan *et al.*, 1997).

Las micobacterias pueden clasificarse de diversas formas, siendo la más aceptada aquella que las diferencia en dos grandes grupos en base a las características de su cultivo microbiológico:

Micobacterias difícilmente cultivables o no cultivables, productoras de lesiones dérmicas y nerviosas (*M. leprae* y *M. lepraemurium*).

Micobacterias cultivables, que atendiendo a la velocidad de crecimiento se dividen en:

- a) crecimiento rápido, es posible obtener colonias en menos de 7 días.
- b) crecimiento lento, requieren como mínimo de 2 a 6 semanas para que se produzca el crecimiento. Dentro de este grupo se incluyen aquellas micobacterias de mayor importancia en medicina veterinaria y Salud Pública. A su vez, aquellas especies de crecimiento lento se han clasificado en tres grupos en función de la producción de pigmentos en presencia/ausencia de luz:
 - b.1) fotocromógenas forman colonias amarillas en presencia de luz (grupo I),
 - b.2) escotocromógenas forman colonias de color amarillo intenso – anaranjado en oscuridad (grupo II),
 - b.3) no cromógenas, no producen pigmentos (grupo III).

Además, las **micobacterias cultivables** también se pueden clasificar desde el punto de vista clínico, dividiéndose en:

- a) micobacterias productoras de tuberculosis, donde se encuentran las especies responsables de la enfermedad (especies del MTBC),
- b) micobacterias no productoras de tuberculosis, también denominadas atípicas, micobacterias no tuberculosas o micobacterias ambientales potencialmente patógenas (*mycobacteria other than tuberculosis*: MOTT o *non-tuberculous mycobacteria*: NTM).

Dentro del género *Mycobacterium* existe también el denominado complejo *M. avium* (MAC), en el que se incluyen agentes patógenos para el ser humano y los animales, y cuya infección puede originar interferencia con las pruebas diagnósticas de la tuberculosis debido a la similitud antigénica existente entre especies del mismo género (Cooney *et al.*, 1997). Dentro del MAC las especies más relevantes son *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *silvaticum*, causantes de micobacteriosis principalmente en aves y otras especies domésticas, y *M. avium* subsp. *hominissuis*, potencialmente patógeno para el ser humano (Mijs *et al.*, 2002) y los animales. También se incluye *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne en rumiantes, y que se vincula a la enfermedad de Crohn en humanos (Chiodini *et al.*, 2012, Thorel *et al.*, 1990).

Todas las especies del género *Mycobacterium* poseen una pared celular que es la principal responsable de sus características fisiológicas y patogénicas (Pollock & Neill, 2002). Varios integrantes de la misma actúan como componentes antigénicos que inhiben la activación macrofágica, favoreciendo la persistencia de la micobacteria en el hospedador, ya que contribuyen a la producción de citoquinas durante la evolución de la respuesta inmune (Daffe & Draper, 1998, Rastogi *et al.*, 2001) y también les proporciona resistencia frente a agentes microbianos y determinados fármacos (Gorocica *et al.*, 2005). Los principales son el *cord factor* (factor de formación de cordones), el lipoarabinomanano (Toossi & Ellner, 1998) y la proteína de choque térmico α -cristalina de 16 kDa que permite a la micobacteria persistir durante las fases estacionarias de crecimiento, fenómeno conocido como latencia (Parrish *et al.*, 1998, Yuan *et al.*, 1998).

La pared celular presente en los miembros del género *Mycobacterium* está compuesta principalmente por peptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos y lípidos, que le confieren a la misma gran robustez y permite la supervivencia prolongada de las micobacterias en el medio ambiente (Kelly & Collins, 1978). Las micobacterias resisten en gran medida al calor aunque las radiaciones ultravioletas y la pasteurización (exposición a 72°C durante 15 segundos) son capaces de inactivarlas (Biberstein & Hirsch, 1999). En concreto, se ha descrito que para inactivar el 90% de la población bacteriana de *M. tuberculosis*, fue suficiente aplicar una fuente ultravioleta entre 11.000 y 197.000 erg/cm² durante 7 segundos (David *et al.*, 1971), mientras que para disminuir la actividad celular de *M. bovis* BCG, fueron suficientes 24.000 erg/cm² durante 24 segundos (Collins, 1971). Sin embargo, en productos cárnicos se logró la

inactivación de *M. bovis* al disminuir la temperatura entre 6 y 7°C, siendo inferior a la necesaria para inactivar miembros del MAC (Merkal & Whipple, 1980). Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que *M. bovis* sobrevive hasta dos semanas en leche tratada con una temperatura de 20°C, mientras que si se incrementa a 33°C, la viabilidad se reduce a tres días (Michel *et al.*, 2015), siendo de especial importancia en aquellos países con recursos limitados en los que no es posible realizar tratamientos térmicos de pasteurización de los alimentos.

Existen también varios géneros de bacterias taxonómicamente relacionados con el género *Mycobacterium*, cuya infección ha sugerido que puede originar fenómenos de interferencia en las pruebas diagnósticas de tuberculosis debido a la similitud antigénica de ciertos componentes de la pared celular de las micobacterias (Harboe & Nagai, 1984, van der Geize & Dijkhuizen, 2004). Algunos, al igual que las micobacterias, presentan en su genoma un elevado contenido en G+C, como por ejemplo los géneros *Rhodococcus* (McLeod *et al.*, 2006) y *Corynebacterium* (Woese, 1987). Además, los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Actinomyces*, presentan varias regiones diferenciadas con identidad nucleotídica dentro de la secuencia que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico, similar a las que conservan todas las especies de micobacterias y que no aparecen en otros microorganismos (Boddinghaus *et al.*, 1990).

La similitud antigénica observada entre las especies incluidas en el MTBC con el MAC, el grupo de MOTT y otros géneros filogenéticamente relacionados (por ejemplo *Corynebacterium*) es responsable de interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis, que se traduce en una disminución de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas diagnósticas, clasificando incorrectamente tanto animales sanos como infectados (Álvarez *et al.*, 2009, Álvarez *et al.*, 2014a, Aranaz *et al.*, 2006, Vordermeier *et al.*, 2007). Mediante el empleo de técnicas moleculares se ha logrado identificar distintos antígenos que permiten realizar un diagnóstico diferencial entre las micobacterias incluidas en algunas especies del MTBC y ausentes en el resto de especies del género *Mycobacterium* (Vordermeier *et al.*, 2009).

1.1.1.1. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: características antigénicas

Las especies incluidas en el MTBC se caracterizan por presentar un 99,9% de similitud genómica y mostrar secuencias 16S de ARN idénticas (Boddinghaus *et al.*, 1990, Huard *et al.*, 2006, Sreevatsan *et al.*, 1996). El MTBC es una población altamente clonal, con escasa o ausencia evidente de recombinación (intercambio de ADN cromosómico) entre las distintas especies incluidas (Hershberg *et al.*, 2008, Smith *et al.*, 2006, Supply *et al.*, 2003). Las técnicas moleculares que se emplean en la actualidad para la identificación de las especies del MTBC se basan principalmente en la presencia o ausencia de ciertas regiones del genoma bien conservadas, denominadas *regions of difference* (RDs) (Alexander *et al.*, 2010, Gordon *et al.*,

1999) en las cuales se localizan los sistemas de secreción de los principales compuestos antigénicos de las micobacterias. Además de en la presencia de mutaciones puntuales, conocidas como *single nucleotide polymorphism* (SNP), las cuales se han detectado gracias a la publicación de los genomas de algunas especies incluidas en el MTBC (Brosch *et al.*, 2001, Mostowy *et al.*, 2005). Se ha puesto de manifiesto que existe una delección de la región del genoma RD4 a la RD10 (Gordon *et al.*, 1999) y de la RD11 a la RD13 (Brosch *et al.*, 2002) descrita en todos los aislados de *M. bovis*. Por otra parte, se observó que existen tres regiones (RD1, RD2 y RD3) ausentes en *M. bovis* BCG comparado con la cepa original (Brosch *et al.*, 2007, Mahairas *et al.*, 1996). Los antígenos específicos de especies del MTBC que han demostrado potencial para el diagnóstico de la tuberculosis bovina son en su totalidad proteínas (<http://tuberculist.epfl.ch/> consultada el 20 de Octubre de 2015), siendo los más relevantes:

- *Secretory antigenic target-6* kDa (ESAT-6): proteína cuya secreción está regulada por un gen localizado en la región RD1 del genoma que se secreta en las fases iniciales tras la infección (Brodin *et al.*, 2006, Pollock & Andersen, 1997, Sorensen *et al.*, 1995). Está ausente en *M. bovis* BCG, en el 90% del grupo MOTT y en el MAC (Murray *et al.*, 2003); suele emplearse de manera conjunta con la proteína CFP-10 (Vordermeier *et al.*, 2001). ESAT-6 ha demostrado ser capaz de inducir respuesta inmunológica tanto en las pruebas de base celular (Masood *et al.*, 2014, Mon *et al.*, 2014, Moradi *et al.*, 2015, Whelan *et al.*, 2010a), como en las de base humoral (Leng *et al.*, 2014).
- *Culture filtrate protein-10* (CFP-10): proteína de 10 kDa cuya expresión está regulada por un gen localizado en la región RD1 del genoma y suele emplearse de manera conjunta con el ESAT-6 (Berthet *et al.*, 1998, van Pinxteren *et al.*, 2000). CFP-10 también está ausente en *M. bovis* BCG debido a la modificación genética sufrida durante su proceso de atenuación (Mahairas *et al.*, 1996) y ha demostrado ser capaz de inducir respuesta inmunológica tanto en las pruebas de base celular (Araujo *et al.*, 2014, Je *et al.*, 2014, Stavri *et al.*, 2012) como en las de base humoral (Zhu *et al.*, 2014).
- Rv3615c: proteína de la pared celular secretada en elevadas cantidades en animales infectados con especies del MTBC (Sidders *et al.*, 2008). Su nombre se debe a que se identificó en *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998, Malen *et al.*, 2010). Rv3615c está ausente en *M. bovis* BCG (Millington *et al.*, 2011) y ha demostrado ser capaz de inducir respuesta inmune de base celular (Jones *et al.*, 2012, Sidders *et al.*, 2008) y suele emplearse de manera combinada con los dos antígenos anteriores en formato cóctel (Jones *et al.*, 2012).

- Rv3020c: proteína de la pared celular secretada en elevadas cantidades en animales infectados con miembros del MTBC y cuya nomenclatura se debe a que se identificó originalmente en *M. tuberculosis* H37Rv (Jones *et al.*, 2012). Rv3020c ha demostrado reactividad inmunológica específica en las pruebas diagnósticas de base celular (Jones *et al.*, 2010a).
- *Mobility protein of M. bovis* 83 (MPB83): lipoproteína glicosilada de la superficie de la membrana de la micobacteria (Matsuo *et al.*, 1996, Waters *et al.*, 2006b). Se identificó en *M. tuberculosis* H37Rv (también se denomina MPT83) pero se comprobó que también se expresaba en *M. bovis* en elevadas cantidades (Lyashchenko *et al.*, 2001). MPB83 está presente en *M. bovis* BCG (Wiker, 2009) y ha demostrado su potencial diagnóstico en pruebas serológicas empleándose conjuntamente con la proteína MPB70 (Waters *et al.*, 2015a). También se ha estudiado su rendimiento como antígeno en la intradermotuberculinización, en una formulación antigénica con ESAT-6, CFP-10 y MPB70 (Whelan *et al.*, 2010a).
- *Mobility protein of M. bovis* 70 (MPB70): proteína soluble secretada en elevadas cantidades en infecciones producidas por *M. bovis* (Harboe *et al.*, 1990, Matsumoto *et al.*, 1995). Al igual que la anterior, se identificó en *M. tuberculosis* H37Rv (también se denomina MPT70) pero se comprobó que se expresaba principalmente en *M. bovis* (Lyashchenko *et al.*, 2001). MPB70 está presente en *M. bovis* BCG (Wiker, 2009) y ha demostrado su potencial diagnóstico en pruebas serológicas empleándose con la proteína MPB83 para la detección simultánea de anticuerpos (Ac) frente a ambas (Marassi *et al.*, 2011). Existe, sin embargo, cierta controversia sobre su especificidad, ya que en determinados estudios no se han detectado Ac frente a MPB70 en animales con paratuberculosis ni expuestos a *M. avium* (Harboe *et al.*, 1990) mientras que en otros sí (Fifis *et al.*, 1992). También se ha estudiado su rendimiento como antígeno en la intradermotuberculinización en una formulación antigénica junto con ESAT-6, CFP-10 y MPB83 (Whelan *et al.*, 2010).

De todos los miembros incluidos en el MTBC, *M. bovis* y *M. caprae* son los principales agentes etiológicos de tuberculosis en los animales (Palmer, 2007a), ya que se han identificado en multitud de especies domésticas (Aranaz *et al.*, 1996, Pavlik *et al.*, 2002a, Prodinger *et al.*, 2005) y silvestres (de Lisle *et al.*, 2001, Erler *et al.*, 2004).

1.1.1.2. *Mycobacterium bovis*

Dentro del MTBC, *M. bovis* es la especie que presenta un mayor rango de hospedadores y la más ubicua, ya que se ha aislado en todo el mundo (Fitzgerald & Kaneene, 2013). *M. bovis* se reconoció oficialmente como especie en 1970 (Karlson & Lessel, 1970), y su principal hospedador son los bóvidos, incluyendo además del ganado bovino (*Bos taurus*), otras especies de la familia *Bovidae* como el búfalo, bisonte, antílope, topi y el kudú, (Bengis *et al.*, 1996, Clancey, 1977, Cleaveland *et al.*, 2005, de Garine-Wichatitsky *et al.*, 2010, Himsworth *et al.*, 2010, Radunz, 2006, Wobeser, 2009) y muchas especies de la subfamilia *Caprinae*, tales como la cabra, la oveja y el rebeco (Cadmus *et al.*, 2009, Cousins, 2001, Crawshaw *et al.*, 2008, Daniel *et al.*, 2009, Hiko & Agga, 2011, Muñoz Mendoza *et al.*, 2012). También se ha identificado *M. bovis* en el cerdo (Aranaz *et al.*, 2004, Barandiaran *et al.*, 2011, Gortázar *et al.*, 2005, Jenkins *et al.*, 2011, Parra *et al.*, 2003, Schmidbauer *et al.*, 2007) y en el caballo (Keck *et al.*, 2010, Monreal *et al.*, 2001, Sarradell *et al.*, 2015).

Este patógeno se ha descrito también en las principales especies empleadas como mascotas, el perro (Ellis *et al.*, 2006, Shrikrishna *et al.*, 2009) y el gato (Aranaz *et al.*, 1996, Monies *et al.*, 2000). En los últimos años se han detallado numerosos casos de tuberculosis en camélidos, principalmente alpacas, que se emplean cada vez más como animales de compañía (Barlow *et al.*, 1999, Bezos *et al.*, 2013, Twomey *et al.*, 2007, Twomey *et al.*, 2009, Ryan *et al.*, 2008, Veen *et al.*, 1991).

M. bovis también se ha identificado en animales silvestres (Corner, 2006, de Lisle *et al.*, 2001). Como por ejemplo en ciervo común y gamo (Aranaz *et al.*, 2004), jabalí (Martín-Hernando *et al.*, 2007), zorro (Martin-Atance *et al.*, 2005), tejón (Balseiro *et al.*, 2011, Gallagher & Clifton-Hadley, 2000), lince (Briones *et al.*, 2000), conejo y liebre (Pavlik *et al.*, 2002a), erizo (Une & Mori, 2007), zarigüeya (Coleman & Cooke, 2001, Ryan *et al.*, 2006), capibara, león y en diversos primates (O'Brien *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito el primer caso de infección por *M. bovis* en una cría de foca gris (Barnett *et al.*, 2013).

Según el Informe anual de la Autoridad Europea de la Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), en Europa durante el año 2013 se notificaron un total de 903 casos de infección por *M. bovis* en animales distintos del ganado bovino, tales como alpacas y llamas, bisontes, gatos, perros, ciervos, zorros, cabras, cobayas, cerdos, ovejas, y animales mantenidos en zoológicos, siendo el tejón y el jabalí aquellos en los que se notificó un mayor número de casos (EFSA, 2015). Asimismo, durante 2014 y 2015 en España se registró *M. bovis* en un total de siete especies animales (tanto domésticas como silvestres) distintas del ganado bovino, información registrada en la Base de Datos Nacional de Micobacteriosis Animal (mycoDB consultada el 20 de Octubre de 2015).

En el ser humano también se han descrito infecciones por *M. bovis*, principalmente de carácter ocupacional (Cosivi *et al.*, 1998, Jenkins *et al.*, 2011, Michel *et al.*, 2010, Ojo *et al.*,

2008, Rodríguez *et al.*, 2009), siendo especialmente preocupante la identificación de algunos aislados de *M. bovis* multirresistente (Romero *et al.*, 2006). Aproximadamente el 60% de los nuevos casos de tuberculosis por *M. bovis* en humanos registrados en 2013 se produjeron en Asia Sudoriental y en regiones del Pacífico Occidental, siendo África el continente que presenta la mayor tasa de nuevos casos por habitante (datos de la OMS, 2015). En los países pertenecientes a la Unión Europea es obligatorio notificar los casos de la enfermedad en el ser humano, para posteriormente averiguar que miembro del MTBC la ha causado. Sin embargo, en países como Francia, no se identifica que patógeno produjo la enfermedad, por lo que no se puede determinar si los casos de tuberculosis en humanos son producidos por *M. tuberculosis* o por otro miembro del MTBC (EFSA, 2015). Durante 2013, se registraron en Europa un total de 134 casos de tuberculosis producida por *M. bovis* en el ser humano, con una media de 0,03 casos por cada 100.000 habitantes. La mayoría de los casos confirmados se produjeron en Alemania, Reino Unido y España, siendo Irlanda el país en el que se obtuvo la mayor proporción de casos (0,13 casos por cada 100.000 habitantes). Sin embargo, no se pudo establecer ninguna asociación entre los casos de tuberculosis por *M. bovis* en el ser humano y la presencia o ausencia de tuberculosis bovina (EFSA, 2015). Se estima que *M. bovis* es responsable de entre el 7,2 y 15% de los casos de tuberculosis humana en países desarrollados (de la Rua-Domenech, 2006a), aunque el riesgo zoonótico en países en vías de desarrollo representa una mayor amenaza (Ashford *et al.*, 2001).

La principal vía de transmisión de la tuberculosis humana de origen animal es el consumo de productos lácteos no pasteurizados (Biet *et al.*, 2005, Cosivi *et al.*, 1998), generando en la mayoría de los casos tuberculosis extrapulmonar (Dürr *et al.*, 2013). Por tanto, el contacto directo con animales infectados por la vía aerógena (Grange & Yates, 1994, Grange, 2001), se considera fuente de transmisión esporádica, principalmente en aquellas condiciones en las que el sistema inmune del ser humano está comprometido, incrementando el riesgo de transmisión de la enfermedad. De manera ocasional también se ha descrito la infección al manipular canales procedentes de animales infectados (Neill *et al.*, 1989).

La enfermedad en el ser humano es clínica, radiológica y patológicamente indistinguibles independientemente de la especie del MTBC implicada. Por este motivo, es necesario recurrir a técnicas de caracterización molecular para determinar el agente etiológico. Este hecho dificulta en muchos países en vías de desarrollo estimar con precisión la proporción de los casos de tuberculosis humana producidos por *M. bovis*, aunque es muy probable que sea mayor que en los países industrializados (Ayele *et al.*, 2004, Cosivi *et al.*, 1998).

1.1.1.3. *Mycobacterium caprae*

M. caprae se denominó inicialmente como *M. tuberculosis* subsp. *caprae* (Aranaz *et al.*, 1999) y posteriormente como *M. bovis* subsp. *caprae* (Niemann *et al.*, 2002). Finalmente, fue reconocido como una especie del MTBC, y recibió la denominación actual de *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003). Muchos de los aislados del MTBC identificados principalmente en cabras y en otros hospedadores se clasificaron erróneamente como *M. bovis* (Aranaz *et al.*, 1999) aunque años más tarde se demostró mediante pruebas moleculares que el aislado debía ser considerado como *M. caprae*, una nueva especie del MTBC (Aranaz *et al.*, 2003), siendo el ganado caprino su hospedador más habitual en España. También se ha sugerido que *M. caprae* es el principal agente causal de tuberculosis en el ganado doméstico de Europa del este (Erler *et al.*, 2004). Además en Suiza, país declarado oficialmente indemne de tuberculosis bovina (*officially tuberculosis free*: OTF) en 1960 (EU; *Bilateral Agreement between the EU and Switzerland on Trade with Agricultural Products*, Annex 11, 1999), recientemente se ha detectado el primer caso de *M. caprae* en ganado bovino (Swiss Federal Veterinary Office, 2013).

Además del ganado caprino, *M. caprae* se ha identificado en multitud de especies animales. Principalmente se ha aislado en ganado bovino en Alemania (Prodinger *et al.*, 2002), China (Zeng *et al.*, 2013), Croacia (Cvetnic *et al.*, 2007), España (Rodríguez *et al.*, 2011), Hungría (Pavlik *et al.*, 2002a, Pavlik *et al.*, 2002b, Pavlik, 2006), Italia (Boniotti *et al.*, 2009), Portugal (Cunha *et al.*, 2011, Duarte *et al.*, 2008), Suiza (Schoning *et al.*, 2013) y Túnez (Lamine-Khemiri *et al.*, 2014). También se ha confirmado un caso en ovejas en el norte de España (Muñoz Mendoza *et al.*, 2012) y en el cerdo en Hungría (Pavlik *et al.*, 2002a).

En fauna silvestre se ha descrito *M. caprae* en el ciervo en Alemania (Domogalla *et al.*, 2013), Austria (Schoepf *et al.*, 2012), Hungría (Pavlik *et al.*, 2002a), Italia (Chiari *et al.*, 2014) y Portugal (Duarte *et al.*, 2008). También se ha aislado en el jabalí en España (García-Jiménez *et al.*, 2013), Portugal (Cunha *et al.*, 2011) y el centro de Europa (Erler *et al.*, 2004, Machackova *et al.*, 2003). Además, en regiones libres de tuberculosis bovina como el oeste de Australia, se han descrito varios brotes de esta enfermedad producida por *M. caprae* en ganado vacuno y en cérvidos (Prodinger *et al.*, 2002). También se ha aislado *M. caprae* en animales de zoo, como por ejemplo en un tigre siberiano (Lantos *et al.*, 2003), y en Eslovenia, en camélidos y en bisontes (Pate *et al.*, 2006).

En Europa, durante 2013 se notificaron 544 casos de tuberculosis debidos a *M. caprae* en ganado bovino, ciervos, zorros, ovejas y jabalíes en Austria, Alemania, Hungría y España, siendo el ganado bovino la especie en la que se identificó un mayor número de aislados (EFSA, 2015). En España se identificó *M. caprae* en tres especies animales distintas del ganado caprino (jabalí, cerdo y oveja) durante 2014 y 2015, (mycoDB consultada el 20 de Octubre de 2015). Además, en España, se detectó un incremento significativo de la infección

producida por *M. caprae* en el ganado bovino durante el periodo comprendido entre 2004-2009 (Rodríguez et al., 2011).

En el ser humano también se han descrito casos de tuberculosis producida por *M. caprae* (Prodinger et al., 2014), principalmente en Alemania (Kubica et al., 2003), España (Gutiérrez et al., 1997), Francia (Aime et al., 2012) y Turquía (Bayraktar et al., 2011). Sin embargo, no se ha estimado con exactitud la proporción de casos de tuberculosis humana producidos por *M. caprae* (Dürr et al., 2013, Muller et al., 2013). La mayoría de los estudios con aislados de *M. caprae* en el ser humano se han realizado en los países del centro-este de Europa (Prodinger et al., 2005), ya que la prevalencia de *M. caprae* en animales es elevada en estos países y, por ende, aumenta la probabilidad de transmisión al hombre. Un estudio realizado en Alemania, puso de manifiesto que *M. caprae* era responsable de un tercio de los casos de tuberculosis en humanos atribuidos a *M. bovis* (Kubica et al., 2003). En otros estudios epidemiológicos realizados en Alemania, República Checa, Croacia y Hungría con cepas de *M. caprae* procedentes de animales domésticos y silvestres, se identificaron aislados que previamente habían sido descritos en el ser humano (Cvetnic et al., 2007, Erler et al., 2004). Mientras que en España, en un estudio retrospectivo realizado entre los años 2004 y 2007 se estimó que la prevalencia la tuberculosis en humanos producida por *M. caprae* fue del 0,3% (Rodríguez et al., 2009).

1.1.2. Tuberculosis en animales

La primera evidencia de tuberculosis en animales se confirmó en el fósil de un bisonte de 17.000 años de antigüedad, localizado en Wyoming (Estados Unidos) (Rothschild et al., 2001). En un principio se creyó que la enfermedad se había desarrollado en los animales, y posteriormente se había adaptado al ser humano durante la domesticación del ganado. El proceso de evolución del bacilo tuberculoso se basa en la pérdida de ADN de los diferentes linajes (Brosch et al., 2001), lo que se traduce en la presencia o ausencia de ciertas regiones del genoma. Por este motivo, el descubrimiento del genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998) y de *M. bovis* AF2122/97 (Garnier et al., 2003) puso de manifiesto que ambas secuencias genómicas presentaban más de un 99,95% de coincidencia, y que *M. bovis* tenía un tamaño genómico más reducido debido a que sufrió la supresión de información genética, confirmando que el origen de la enfermedad fue en el ser humano, adaptándose posteriormente a los animales (Brosch et al., 2001, Garnier et al., 2003).

El amplio rango de hospedadores que presenta esta enfermedad dificulta el control de la misma, siendo especialmente delicadas aquellas situaciones en las que el hospedador es una especie amenazada, como por ejemplo el lince ibérico (*Lynx pardinus*) en España. Además, en el caso de la fauna silvestre es necesario diferenciar si los animales actúan como reservorios/fuente de infección manteniendo la enfermedad en el ecosistema, o como fondo

de saco (*spill over host*), siendo compleja la clasificación en un grupo u otro (Daszak *et al.*, 2000).

Se han notificado casos de tuberculosis en multitud de especies domésticas (Pesciaroli *et al.*, 2014): ganado bovino (McNair *et al.*, 2007), caprino (Bezoz *et al.*, 2011a, Cadmus *et al.*, 2009), ovino (Cousins *et al.*, 1993, Malone *et al.*, 2003, Muñoz Mendoza *et al.*, 2012) porcino (Parra *et al.*, 2003) y en équidos (Keck *et al.*, 2010, Monreal *et al.*, 2001), camélidos (Álvarez *et al.*, 2012a, Bezoz *et al.*, 2013) y roedores (Kipar *et al.*, 2014). En los animales que de manera tradicional se consideran mascotas para el ser humano también se ha identificado esta enfermedad, como en cánidos (Ellis *et al.*, 2006) y félidos (Aranaz *et al.*, 1996, Cima, 2014, de Lisle *et al.*, 1990, Fenton *et al.*, 2010). Si bien es cierto que los aislados hallados en el perro se han identificado como *M. bovis* (Shrikrishna *et al.*, 2009) o *M. tuberculosis* (Erwin *et al.*, 2004, Parsons *et al.*, 2012), mientras que en el gato se ha confirmado la presencia de *M. bovis* y *M. microti* (Gunn-Moore *et al.*, 2011). Además, también se ha descrito susceptibilidad a la infección en el hámster (Glover, 1946) y en el hurón (Pollock, 2012).

La tuberculosis también se ha descrito en animales silvestres que podrían considerarse fuente de infección para las especies de abasto, y esporádicamente para el hombre (contacto ocupacional: veterinarios, personal de mataderos, cazadores y cuidadores cuando estas especies están mantenidas en cautiverio). Las principales especies no domésticas en las que se ha descrito la enfermedad son el jabalí en España (Gortázar *et al.*, 2011, Naranjo *et al.*, 2008, Nugent *et al.*, 2015), el ciervo de cola roja en España y de cola blanca en Michigan (Estados Unidos) (Gortázar *et al.*, 2011, Kukiela *et al.*, 2013), la zarigüeya en Nueva Zelanda (Palmer, 2013), el búfalo en Suráfrica (Michel, 2002) y el tejón en Irlanda y Reino Unido (Balseiro *et al.*, 2013, Tomlinson *et al.*, 2015). Aunque también se ha detectado la enfermedad en muchas otras especies tales como el hipopótamo (Bouts *et al.*, 2009), el lince (Briones *et al.*, 2000, Gortázar *et al.*, 2008), el león (Viljoen *et al.*, 2015), el elefante (Maslow & Mikota, 2015, Ong *et al.*, 2013) y los primates (Shin *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 2013).

La tuberculosis en mamíferos marinos se ha descrito tanto en animales en libertad (Bastida *et al.*, 1999, Forshaw & Phelps, 1991, Woods *et al.*, 1995) como en ejemplares mantenidos en cautividad (Forshaw and Phelps, 1991). El principal agente etiológico de la tuberculosis en los mamíferos marinos es *M. pinnipedii*, aunque también se han notificado casos puntuales de infección por esta especie en ganado bovino (Loeffler *et al.*, 2014) y en otras especies animales alojadas en parques zoológicos: un tapir, un camello y un puercoespín (Jurczynski *et al.*, 2011). Además, recientemente se ha publicado el primer caso de infección por *M. bovis* en una cría de foca gris en Reino Unido (Barnett *et al.*, 2013).

En las aves, generalmente de manera imprecisa, se habla de tuberculosis aviar para referirse a la producida por *M. avium*, cuando el término correcto sería micobacteriosis aviar

(Dvorska *et al.*, 2007), ya que el agente causal no se encuadra dentro del MTBC (OIE, 2008). La tuberculosis en aves se ha descrito de manera ocasional producida por *M. tuberculosis* en ejemplares empleados como mascotas (canarios, guacamayos y loros) de individuos enfermos (Hoop, 2002, Schmidt *et al.*, 2008, Washko *et al.*, 1998). También se han notificado casos en ejemplares, principalmente psitácidas, que viven en zoológicos (Montali *et al.*, 2001). Además, se ha detallado la infección producida por *M. bovis* en loros (Altman, 1997) y recientemente, se ha notificado un caso de *M. bovis* en dos avestruces, una procedente de un zoológico y la otra de una granja (Kelly *et al.*, 2013).

La tuberculosis en reptiles y anfibios se ha descrito esporádicamente, estando causada principalmente por *M. tuberculosis* y afectando a animales mantenidos en zoológicos o empleados como mascotas, sugiriendo que una posible vía de transmisión podría ser del ser humano al animal (Shindarov & Todorov, 1962, Une & Mori, 2007). En estas especies animales también es frecuente identificar otras micobacterias no incluidas en el MTBC [principalmente *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. chelonae* (Ebani *et al.*, 2012)] y que son potencialmente patógenas para el ser humano (Mitchell, 2012, Reavill & Schmidt, 2012).

1.1.2.1. Tuberculosis en rumiantes

El agente etiológico por excelencia de la tuberculosis en rumiantes es *M. bovis* (Palmer, 2013, Pesciaroli *et al.*, 2014). La tuberculosis bovina es una zoonosis de distribución mundial debido posiblemente al movimiento del ganado domesticado durante la colonización (Smith, 2012), si bien es cierto que la enfermedad presenta grandes variaciones en su prevalencia. Mientras que en algunos países desarrollados, está erradicada o se encuentra en una fase más o menos avanzada de erradicación, en la mayoría de los países en desarrollo sigue siendo en muchos casos una enfermedad endémica (Habarugira *et al.*, 2014). En Canadá, Estados Unidos y Europa occidental, la infección se ha reducido en determinadas localizaciones a niveles inferiores al 0,1 % (Koller-Jones, 2010, Reviriego Gordejo & Vermeersch, 2006, *United States Department of Agriculture*, 2009, Wobeser, 2009). En Centro América, con excepción de Nicaragua y el Caribe, tiene porcentajes de animales afectados muy bajos (menos del 1%) (Abalos & Retamal, 2004, de Kantor & Ritacco, 2006), mientras que Cuba está libre de la enfermedad (Abdala, 1998). A nivel mundial las prevalencias más elevadas se encuentran en América del Sur (de Kantor & Ritacco, 2006), en buena parte del territorio de África y ciertas partes de Asia, siendo las cuencas lecheras las zonas más afectadas (Cosivi *et al.*, 1998).

Uno de los principales problemas que plantea esta enfermedad es que la sintomatología no es patognomónica y no aparece hasta una fase tardía de la misma (Pollock *et al.*, 2001). Una vez infectado el animal, se reduce su productividad. Se estima que en el ganado bovino la tuberculosis causa aproximadamente una disminución en un 10-20% de la

producción lechera y cárnica (Bennett & Cooke, 2006, Boland *et al.*, 2010) y una disminución del 5% en la capacidad reproductiva de los rebaños; todo ello unido a las restricciones que conlleva la aparición de un brote.

La tuberculosis bovina es una enfermedad de declaración obligatoria, incluida en la lista de la OIE (Enfermedades de la Lista de la OIE, 2015), por lo que el ganado bovino está sometido a campañas oficiales de erradicación a nivel mundial en los países desarrollados. Si bien inicialmente se definió la tuberculosis bovina como la infección producida por *M. bovis* (Braun & Lebek, 1958, Francis, 1958, McMurray, 1941, Schmiedel, 1966, Schmiedel, 1968), ampliándose posteriormente a todas las especies del género *Bos* incluyendo el búfalo (*Bubalus bubalus*) y el bisonte (*Bison bison*) y como agente causal cualquiera incluido en el MTBC (*Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force*, 2013).

La tuberculosis caprina tiene cada vez mayor relevancia, *M. caprae* se ha identificado tanto en países con tuberculosis bovina (España, Portugal, etc.), como en países calificados OTF (Suiza). Se considera que en algunos países como España (Aranaz *et al.*, 2003), Portugal (Duarte *et al.*, 2008) o en algunas regiones de Europa del este (Erler *et al.*, 2004), *M. caprae* es el principal agente causal de la enfermedad, aunque también se ha aislado *M. bovis* en ganado caprino con tuberculosis (Quintas *et al.*, 2010). Mientras que en otros como Etiopía (Hiko & Agga, 2011, Taffes *et al.*, 2011) o Nigeria (Cadmus *et al.*, 2009), se ha descrito también tuberculosis en ganado caprino producida principalmente por *M. bovis* y en menor caso debido a *M. tuberculosis*. Sin embargo, en Algeria (Naima *et al.*, 2011), Irlanda (Shanahan *et al.*, 2011, Sharpe *et al.*, 2010), Italia (Zanardi *et al.*, 2013), y Reino Unido (Crawshaw *et al.*, 2008, Daniel *et al.*, 2009), en los casos de tuberculosis caprina registrados hasta la fecha, se ha identificado únicamente *M. bovis* como agente causal. Del mismo modo que se describe para la tuberculosis bovina, la tuberculosis caprina podría definirse como la enfermedad producida en el ganado caprino por cualquier especie incluida en el MTBC. Ciertos estudios han sugerido que la especie caprina puede ser fuente de infección para el ganado bovino (Zanardi *et al.*, 2013, Napp *et al.*, 2013), pudiendo comprometer la erradicación de la enfermedad en esta especie (Humblet *et al.*, 2009, Napp *et al.*, 2013).

Debido a que la tuberculosis caprina no está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE, no está sometida a campaña de erradicación específica, excepto en aquellos países con tuberculosis bovina, cuando la leche se destina para la producción de quesos en crudo y existe convivencia del ganado bovino y caprino (EC *Regulation* 853/2004). Por este motivo existe escasa información acerca de la prevalencia de la enfermedad en ganado caprino.

En España, se realizan pruebas oficiales de diagnóstico en aquellas explotaciones de caprino que conviven, aprovechan pastos comunes o mantienen relación epidemiológica con explotaciones de bovino no libre de la enfermedad; y también en aquellas explotaciones que, aunque no cumpliendo con el requisito de convivencia, se detecten mediante la encuesta

epidemiológica y/o la Base de Espoligotipos como fuente de la enfermedad para las explotaciones de bovino del área de explotación [Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2015)]. Además, desde hace algunos años, en las comunidades autónomas con mayor censo caprino se han puesto en marcha programas de control y erradicación de la tuberculosis, empleando las mismas técnicas diagnósticas y criterios de interpretación que los aplicados en el ganado bovino (Bezós *et al.*, 2012a). Por ejemplo en Castilla y León, el programa en el ganado caprino se inició en el año 2002 de manera voluntaria. En 2007, la prevalencia de tuberculosis era del 10,7%, disminuyendo al 1,9% en el año 2012, año a partir del cual el saneamiento de todas las explotaciones caprinas de la comunidad fue obligatorio. Durante los años 2013 y 2014 la prevalencia se mantuvo en 1,7% y 1,9% respectivamente. Además desde el año 2014, la primera prueba diagnóstica que se realiza en una explotación de ganado caprino es la intradermotuberculinización comparada, y una vez que se ha confirmado la infección, se emplea la prueba de la intradermotuberculinización simple (Información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León, Septiembre de 2015).

1.1.2.1.1. Situación actual de la tuberculosis bovina en Europa

En el ganado bovino la importancia de la tuberculosis se debe principalmente a que al tener un contacto estrecho con el ser humano se incrementa el riesgo de transmisión de la enfermedad (Haydon *et al.*, 2002), y a las cuantiosas pérdidas económicas derivadas de la misma: coste de las campañas de erradicación, indemnizaciones a los propietarios, restricción en los movimientos de ganado y productos animales y descenso en la productividad de los animales (Bennett & Cooke, 2006, Schiller *et al.*, 2011). Además, tiene gran impacto negativo en la sociedad, ya que produce cierta desmotivación tanto en los ganaderos como en los profesionales veterinarios que se enfrentan a su erradicación, debido principalmente a que las pruebas diagnósticas actualmente en uso para la tuberculosis bovina en ocasiones no son capaces de identificar correctamente a los animales infectados y/o sanos, manteniendo la infección en la explotación y sacrificando una proporción variable de animales sanos (Álvarez *et al.*, 2014a, Humblet *et al.*, 2009).

El ganado bovino está sometido a campañas oficiales de erradicación a nivel mundial en los países desarrollados, por este motivo, los datos más precisos sobre la prevalencia de tuberculosis son los que se recogen a partir de dichas campañas en esta especie. Los programas de erradicación están basados en el diagnóstico y sacrificio de los animales positivos, con el fin de identificar a tiempo y eliminar eficazmente los animales infectados (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994). Por ello, las técnicas diagnósticas incluidas en los programas son aquellas que detectan la respuesta inmune de base celular, que es la primera implicada en el control de la infección (Pollock & Neill, 2002). Si bien la

tuberculosis bovina estuvo presente en todo el mundo alguna vez (Smith, 2012), debido a la implementación de programas de erradicación se ha logrado su control, disminuyendo su prevalencia (Reviriego Gordejo & Vermeersch, 2006, Schiller *et al.*, 2011, Thoen *et al.*, 2009) e incluso erradicándose en varios países (Tweddle & Livingstone, 1994).

La situación de la tuberculosis bovina en Europa varía en función de los distintos países. Algunos se consideran calificados OTF, mientras que otros no han logrado alcanzar todavía dicha calificación. Por último, en algunos países existen ciertas regiones que se han declarado OTF, pero no la totalidad de su territorio. Los países calificados como OTF mantienen el control de la enfermedad mediante muestreos en mataderos y pruebas diagnósticas que se realizan antes del movimiento de los animales cuando el país de destino lo requiera (Anon, 2009b), mientras que en los países en los que la infección está presente se aplican los programas de erradicación de la enfermedad. Durante el periodo comprendido entre 2006 y 2012, la proporción de explotaciones infectadas con *M. bovis* en los países miembros de la Unión Europea se mantuvo inferior al 1% (EFSA, 2014) aunque en los últimos años se ha notificado un incremento en la prevalencia de tuberculosis (Anon, 2009a). En 2013, de la totalidad de explotaciones de ganado bovino localizadas en países miembros no calificados como OTF (1.362.234), se confirmó la infección producida por *M. bovis* en 18.256 (1,33%), siendo similar a la proporción obtenida en 2012, mientras que la proporción de explotaciones infectadas de la Unión Europea fue 0,68%, cifra similar a la alcanzada en 2012 (EFSA, 2015). En la Figura 1 se muestra la proporción de explotaciones infectadas con *M. bovis* sobre el total de países pertenecientes a la Unión Europea, y sobre aquellos calificados OTF y sobre los que no han alcanzado el estatus OTF.

Actualmente y de acuerdo con la normativa Europea (*Decision* 2012/204/EU29), los países calificados OTF en Europa son: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, Estonia, Finlandia, Francia, Islandia, República Checa, Letonia, Liechtenstein, los Países Bajos, Luxemburgo, Noruega, Polonia, Suecia y Suiza.

Aquellos países en los que se han declarado distintas regiones como OTF son Italia, Reino Unido y Portugal. En Italia se declararon 5 regiones y 17 provincias como OTF. En Reino Unido, Escocia se declaró como OTF en 2009, mientras que en Portugal, recientemente se ha calificado como OTF la zona del Algarve.

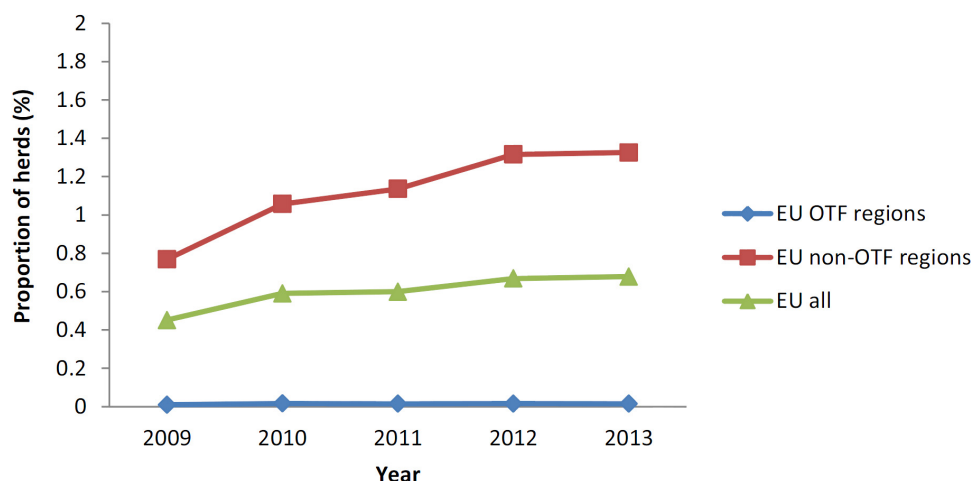


Figura 1. Proporción de explotaciones infectadas con *M. bovis* sobre el total de países calificados OTF de la Unión Europea (línea azul), sobre aquellos en los que no se ha erradicado la infección (línea roja) y sobre todos los países miembros (línea verde) durante el 2009 y el 2013. Fuente: EFSA, 2015.

Por último, aquellos países en los que la infección sigue presente en toda su extensión geográfica son: Bulgaria, Chipre, Croacia, España, Grecia, Hungría, Irlanda, Lituania, Malta y Rumanía (EFSA, 2015). Además, en aquellos países no calificados OTF, la prevalencia de la tuberculosis bovina es muy dispar, siendo inferior al 0,1% en algunas zonas mientras que en otras es superior al 10% (EFSA, 2015). En la Figura 2 se muestra la situación de la tuberculosis bovina en Europa en el año 2013.

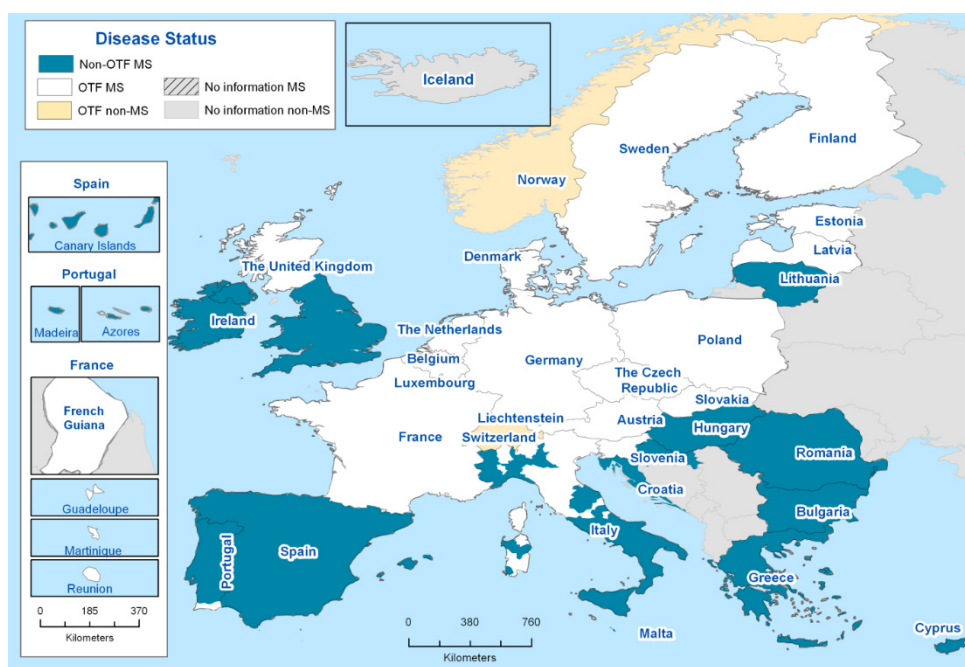


Figura 2. Situación de la tuberculosis bovina a nivel Europeo en el año 2013. Fuente: EFSA, 2015.

De los 28 países que integran actualmente la Unión Europea, en 25 se informa de todos los casos de tuberculosis detectados en cualquier especie animal, también en Noruega y Suiza. Mientras que en países como Chipre, Grecia, Hungría, Polonia y Rumanía se informa únicamente de los casos de tuberculosis bovina y en Irlanda, de aquellos casos que se detectan en rumiantes (EFSA, 2015). Asimismo, un país calificado como OTF debe notificar los casos de *M. bovis* identificados en cualquier especie animal (Hadorn & Stark, 2008, Schoning *et al.*, 2013). Siempre que la proporción de explotaciones de ganado bovino infectadas anualmente sea inferior a 0,1% durante seis años consecutivos y que al menos el 99,99% de los rebaños sean oficialmente libre durante esos seis años consecutivos, se mantendrá la calificación OTF (Directiva Europea 64/432/CEE). Durante los últimos años no se ha detectado ningún caso de tuberculosis bovina en 10 de los países calificados OTF pertenecientes a la Unión Europea, ni en Islandia ni en Noruega. Sin embargo, en 2013 se identificaron un total de 207 explotaciones infectadas con *M. bovis* en Alemania (46 explotaciones), Bélgica (9 explotaciones), Escocia (3 explotaciones), Francia (112 explotaciones), Holanda (3 explotaciones), Polonia (20 explotaciones), Suiza (10 explotaciones) y Veneto, región de Italia (4 explotaciones). La proporción de explotaciones infectadas con *M. bovis* de los países europeos calificados como OTF en 2013 fue 0,015%, cifra similar a la que se obtuvo en 2012 (EFSA, 2015).

En Europa, la normativa que regula la información en relación a las pruebas oficiales para el diagnóstico de tuberculosis bovina en aquellos países cuyo programa de erradicación está co-financiado por la Unión Europea, es la Directiva Europea 64/432/CEE con sus modificaciones posteriores. Sin embargo esta directiva deja diversos aspectos sin definir, tales como el criterio de interpretación de las pruebas, frecuencia de realización de las mismas, etc. A nivel Europeo la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) o prueba intradérmica, es la prueba oficial para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. La prueba de la IDTB simple se emplea de rutina en España, Italia y Croacia mientras que la IDTB comparada es la que se usa en Reino Unido, Irlanda y Portugal (Bezós *et al.*, 2014b).

Como herramientas adicionales para el control de la enfermedad en Europa, se dispone del grupo de trabajo de tuberculosis bovina de la *Task Force (Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force)*, formado por miembros de países con programas de erradicación co-financiados por la Unión Europea y expertos/asesores científicos. Su objetivo es monitorizar el funcionamiento de los programas de erradicación de las enfermedades animales y mejorar el ratio coste-beneficio de aquellos programas de erradicación co-financiados por la Unión Europea. Para ello este grupo de trabajo proporciona asistencia técnica a aquellos países que la requieran y evalúa periódicamente los programas de erradicación de tuberculosis bovina presentados por los respectivos países. Otra herramienta adicional para el control de la enfermedad es el *European Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis* (EU-RL) (Directiva Europea 737/2008) que tiene entre sus objetivos principales

la armonización y estandarización de las pruebas diagnósticas disponibles para el control de la enfermedad a través de los distintos Laboratorios Nacionales de Referencia (*National Reference Laboratories*) europeos.

1.1.2.2. Tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas)

En la familia *Camelidae* se diferencian los camélidos de Sudamérica o del Nuevo Mundo [en el que se incluyen entre otros la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*)] y los camélidos del Viejo Mundo (camellos y dromedarios). Tanto la llama como la alpaca se consideran las principales especies domésticas, ya que son fuente de fibra, carne, y de subproductos como cuero, que tienen múltiples usos industriales y artesanales. El interés en los camélidos de Sudamérica para la producción de fibra o como animales de compañía (D'Alterio *et al.*, 2006), ha aumentado recientemente en Australia, Canadá, Estados Unidos, Nueva Zelanda, y algunos países europeos como Alemania, España, Francia, Irlanda, Italia y Reino Unido (Brown, 2000, Connolly *et al.*, 2008, Sharpe *et al.*, 2010), incrementando el riesgo de transmitir la enfermedad al ser humano en caso de infección (Twomey *et al.*, 2010b). Además también se han descrito brotes de tuberculosis en estos animales en países calificados OTF como Los Países Bajos (Dinkla *et al.*, 1991).

Los brotes de tuberculosis en camélidos de Sudamérica debidos a *M. bovis* se han incrementado en los últimos años, especialmente en zonas que presentan elevada prevalencia de tuberculosis bovina (García-Bocanegra *et al.*, 2010, Ryan *et al.*, 2008, Twomey *et al.*, 2012). En Reino Unido se notificaron un total de 42 brotes en explotaciones de llamas o alpacas desde 2003 hasta 2009, siendo la incidencia cada vez superior (Twomey *et al.*, 2010a). Los camélidos de Sudamérica han demostrado ser altamente susceptibles a la enfermedad cuando la infección se produce por *M. microti* y *M. bovis*. Sin embargo es necesario destacar que hasta la fecha no se han notificado casos de infección en estos animales producida por otros miembros del MTBC. Por norma general, la presencia de la enfermedad en alpacas pasa inadvertida, sin signos clínicos aparentes hasta que el animal muere súbitamente o es necesario sacrificarlo por razones humanitarias. Aunque en ocasiones también pueden mostrar una clínica inespecífica, como decaimiento y problemas respiratorios (Lyashchenko *et al.*, 2007, Twomey *et al.*, 2010b). Sin embargo en las llamas, los animales infectados pueden permanecer sin ninguna clínica y finalmente fallecer debido a infecciones concomitantes (Barlow *et al.*, 1999).

Los camélidos no están sometidos a campaña de erradicación de tuberculosis de forma obligatoria, pero se someten a pruebas diagnósticas antes de realizar movimientos de animales o cuando se confirma la infección en la explotación (Pesciaroli *et al.*, 2014), siendo la IDTB la prueba oficial (Directiva Europea 92/65/CEE). Se ha descrito una falta en la estandarización de las pruebas diagnósticas en estos animales debido principalmente a la

escasez de información, y a pesar de que se han evaluado diversos protocolos, el rendimiento de las mismas es limitado (Álvarez *et al.*, 2012a). La infección de estos animales en su hábitat natural ha sido escasamente documentada y además se desconoce la prevalencia de la tuberculosis. Asimismo, es necesario tener en consideración que las condiciones epidemiológicas en su hábitat natural difieren a las que estos animales se ven sometidos fuera de sus países originales, como por ejemplo el sistema de manejo. En su hábitat original los animales permanecen en régimen extensivo, con escaso contacto entre individuos, mientras que fuera de ellos se mantienen en granjas en las que la tasa de hacinamiento es variable, sugiriendo que al igual que ocurre en el ganado bovino, el hacinamiento en condiciones intensivas les predispone a ser más susceptibles a la infección por *M. bovis* (Griffin *et al.*, 1993b). Otra condición que puede influir en el desarrollo de la infección es el factor ambiental del altiplano, ya que la altitud media a la que se encuentran los animales en Sudamérica es de 3.800 metros sobre el nivel del mar. Sin embargo, el efecto de la altitud tanto sobre la susceptibilidad a la infección, como en el progreso de la misma, no ha sido completamente esclarecido (Saito *et al.*, 2006, Vargas *et al.*, 2004). Por este motivo, hasta la fecha no se ha podido demostrar si bajo sus condiciones de origen la susceptibilidad a la infección es menor en estos animales (Oevermann *et al.*, 2004).

En los últimos años, la tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas) ha suscitado gran interés desde la Unión Europea debido a las dificultades que entraña su diagnóstico empleando las técnicas tradicionales aplicadas en el ganado bovino. Por este motivo es necesario profundizar en el estudio de nuevos protocolos diagnósticos que permitan incrementar la detección de animales infectados (Bezoz *et al.*, 2013, Rhodes *et al.*, 2012) y minimizar las respuestas inespecíficas en animales sanos, especialmente antes de realizar movimientos de los mismos.

1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA TUBERCULOSIS

A pesar de que se conocen muchos de los mecanismos desencadenados tras la infección producida con cualquier miembro incluido en el MTBC, comprender con exactitud los fenómenos que ocurren en todas las fases de la enfermedad es esencial para mejorar el rendimiento de las pruebas diagnósticas e investigar el desarrollo de nuevas alternativas. La respuesta inmune que se origina tras la infección ha sido considerablemente estudiada en el ser humano, principalmente cuando la infección se produce por *M. tuberculosis* (Achkar *et al.*, 2015, Jasenosky *et al.*, 2015, Lin & Flynn, 2015). Además, la gran similitud genética observada entre los miembros del MTBC parece sugerir que la respuesta inmune inducida tras la infección podría ser similar independientemente de la especie causal (Waters *et al.*, 2011b). Sin embargo, existe poca información disponible al respecto, a pesar de que se hayan descrito

diferencias en la respuesta inmune generada por cepas de *M. tuberculosis* con distinta virulencia (Repasy *et al.*, 2015).

En los últimos años se están realizando multitud de estudios mediante modelos de infección experimental y expresión génica para lograr comprender el mecanismo de interacción patógeno-hospedador. Algunos de ellos son la mosca de la fruta (Myllymäki *et al.*, 2015), el pez cebra (Cronan & Tobin, 2014, Davis *et al.*, 2002), el modelo de ratón (Robinson *et al.*, 2015), las cobayas (Clark *et al.*, 2014), los conejos (Flynn *et al.*, 2008), el ganado caprino (de Val Perez *et al.*, 2011) y bovino (Baldwin & Telfer, 2015, Pollock & Neill, 2002, Pollock *et al.*, 2006), y los primates (Pena & Ho, 2015, Wareham *et al.*, 2014).

1.2.1. Patogénesis de la tuberculosis en ganado bovino

La principal vía de infección en la tuberculosis del ganado bovino es la vía aerógena o respiratoria, mediante la inhalación de la bacteria. La vía oral o digestiva no se considera vía principal de infección, y cuando se produce, puede ser debida al consumo de leche procedente de animales infectados, y en menor medida producida por la ingestión de la micobacteria en pastos, agua o fómites contaminados (Menzies & Neill, 2000). Otras vías de transmisión, como la venérea o la vertical, son posibles pero poco probables (Ozyigit *et al.*, 2007). Así como la infección a través de heridas, que se ha descrito aunque es muy poco frecuente en animales (Flohr *et al.*, 2009, Guilbride, 1963), y se debe a la contaminación de lesiones primarias con las micobacterias, limitándose normalmente al punto de entrada y al linfonodo regional.

La dosis mínima necesaria para producir la infección en el hospedador difiere según diversos factores, siendo uno de los principales la vía empleada, ya que se ha comprobado que la dosis necesaria para reproducir la infección de manera experimental es inferior por la vía respiratoria que por la digestiva. Por ejemplo, en ganado bovino infectado de forma experimental se ha demostrado que para reproducir la infección por la vía digestiva son necesarios 10 mg de bacilos tuberculosos, mientras que al emplear la vía respiratoria la carga bacteriana necesaria se reduce a 0,01 mg (Dean *et al.*, 2005). En otros estudios realizados con ganado bovino, se puso de manifiesto que dosis mínimas de entre 1 y 5 bacilos fueron capaces de producir infección mediante la vía respiratoria (Johnson *et al.*, 2007, Neill *et al.*, 1991) mientras que se necesitaron del orden de 10^6 bacilos en la vía oral (Francis, 1947). En cobayas infectadas de forma experimental se han descrito resultados similares a los observados en ganado bovino, siendo necesarias dosis infectivas muy superiores para realizar la infección por vía oral, comparado con la vía aerógena (Chambers *et al.*, 2001).

Si a pesar de la respuesta inmune implicada para contener al patógeno este sobrevive, se forma el granuloma tuberculoso, compuesto principalmente por macrófagos, células gigantes de Langhans y linfocitos que tratan de contener a la micobacteria y evitar su

diseminación a otros órganos (Davis & Ramakrishnan, 2009). El conjunto de lesiones en los linfonodos regionales y el órgano de entrada y constituye el denominado complejo primario, el cual se considera incompleto cuando únicamente está afectado el linfonodo regional del órgano correspondiente (en caso de la vía respiratoria los linfonodos traqueobronquiales y/o mediastínicos), cuando además hay afectación en el órgano, se considera complejo primario completo (Figura 3, afectación del linfonodo y del pulmón, en caso de la vía respiratoria).

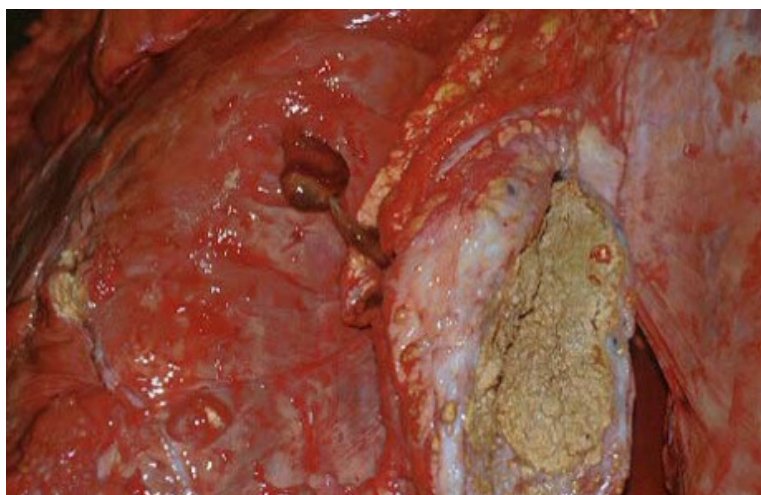


Figura 3. Complejo primario completo en ganado bovino. Se observan lesiones en el linfonodo mediastínico y en el pulmón.

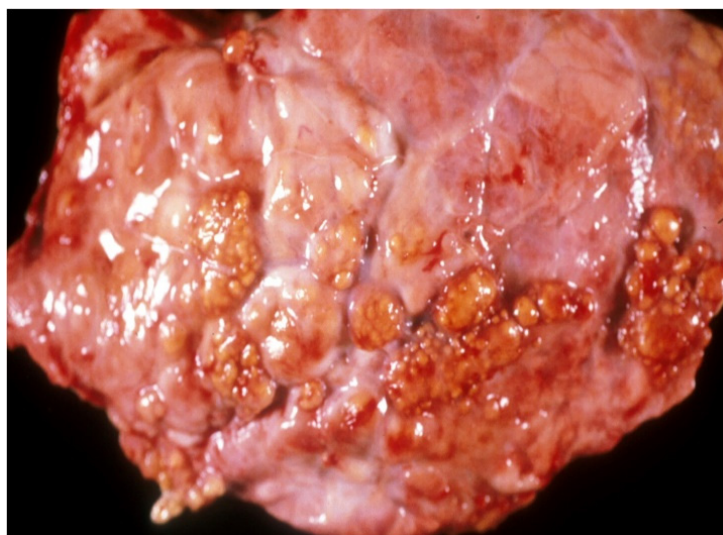


Figura 4. Tuberculosis perlada (nódulos multifocales caseificados de tamaño variable) en la pleura visceral de un bovino.

El complejo primario puede evolucionar hacia la curación, la latencia y en determinadas circunstancias (ante situaciones de estrés, inmunosupresión, etc.) producirse una generalización precoz, en la que hay diseminación de la bacteria por el torrente linfático y hemático, provocando una tuberculosis perlada o miliar que se caracteriza por formar

lesiones granulomatosas principalmente en las membranas serosas (Figura 4). Estas lesiones son típicas de ganado bovino, siendo poco frecuentes en los demás rumiantes (Domingo *et al.*, 2014).

En ocasiones, tras una segunda infección o debido a la reactivación de una tuberculosis latente, se produce el periodo de diseminación post-primario (Pieters & Gatfield, 2002). En este caso, el patógeno no se disemina por el torrente linfático y hemático sino que emplea la vía canalicular, por lo que no hay afectación de linfonodos regionales, limitándose las lesiones al órgano afectado (Domingo *et al.*, 2014). Otra posibilidad es que produzca una forma de ruptura, debido a una generalización tardía por vía linfática y hemática, en este caso la calcificación de las lesiones es mínima (Domingo *et al.*, 2014). Este patrón se ha descrito en situaciones en los que la respuesta de base celular del hospedador ha menguado, denominándose como anérgicos a esos individuos (Lepper *et al.*, 1977b). Por tanto, en aquellos casos en los que se produzca una generalización precoz de la enfermedad o una forma de ruptura, con diseminación de la bacteria vía linfática o hemática, es frecuente observar lesiones granulomatosas en las membranas serosas o en otros órganos distintos al órgano de entrada (Domingo *et al.*, 2014).

De manera convencional, se ha sugerido que los animales que presentan mayor grado de lesiones son los que excretan una mayor carga de micobacterias (Neill *et al.*, 1994a) y que, por tanto, son los más infecciosos (Costello *et al.*, 1998). Sin embargo, se han descrito casos en los que la excreción de la bacteria se produjo en ausencia de lesiones extensas en el hospedador. En un estudio experimental se puso de manifiesto que un animal con una lesión localizada en el linfonodo mediastínico fue igual de infeccioso para los demás que otros que presentaron un mayor grado de lesión (Khatri *et al.*, 2012). Por otra parte, en infecciones experimentales se había considerado que la dosis infectiva empleada era de gran relevancia para el desarrollo y la severidad de las lesiones observadas en el hospedador (Neill *et al.*, 1994a). Sin embargo, en un estudio realizado por Johnson y colaboradores, en el que se infectó de manera experimental un grupo de animales con distintas dosis de *M. bovis* (de 1 a 1000 unidades formadoras de colonias-UFCs), no se observaron diferencias en el cuadro de lesiones desarrollado en el hospedador en función de la dosis empleada para la infección experimental (Johnson *et al.*, 2007).

Debido a que la vía respiratoria es la principal vía de infección en la tuberculosis bovina, se ha descrito que la mayor parte de las lesiones observadas en esta especie se localizan en la cavidad torácica (Corner, 1994, Menzies & Neill, 2000, Whipple *et al.*, 1996). La presencia de lesiones asociadas a los linfonodos mesentéricos sugieren que la infección se produjo mediante la vía digestiva (Domingo *et al.*, 2014). El hallazgo de lesiones en la cavidad abdominal (linfonodos mesentéricos principalmente) es poco frecuente en los países en los que la pasteurización de la leche y los programas de erradicación permiten la eliminación de los animales tuberculosos antes de la diseminación de la micobacteria en el

hospedador (Pollock & Neill, 2002). En un estudio realizado por Neill y colaboradores, en Reino Unido, se estimó que la proporción de lesiones identificadas en la cavidad abdominal era del 3% (Neill *et al.*, 1994a). La presencia de lesiones en el hospedador no se asocia con una excreción constante de la micobacteria, ya que se ha demostrado que esta es intermitente y que depende entre otros factores de la localización, el número de lesiones y del grado de extensión de las mismas (Neill *et al.*, 1991). En los individuos infectados se ha descrito que la vía aerógena es aquella en la que la excreción de la micobacteria es más estable (Neill *et al.*, 1989), en comparación con otras como la leche y orina (Menzies & Neill, 2000).

1.2.2. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata está formada por células y barreras primarias de protección (mucosas, piel intacta, pH, temperatura, etc.) para defender de forma inespecífica al hospedador de la infección por cualquier organismo. Las células del sistema innato reconocen, y responden de forma genérica frente a los patógenos y, a diferencia del sistema inmunitario adquirido, no confiere inmunidad a largo plazo. El sistema inmunitario innato proporciona defensa inmediata contra la infección y se manifiesta tanto en el Reino Animal como en el Reino Vegetal (Kindt *et al.*, 2007).

Tras la entrada de la micobacteria en el hospedador, las células fagocíticas tratan de ponerse en contacto con ella para fagocitarla y eliminarla del organismo. Las células fagocíticas forman parte del grupo de las células presentadoras de antígeno (CPAs), entre las cuales destacan las células dendríticas y los monocitos-macrófagos. Las primeras, son un tipo celular característico del sistema inmune de los mamíferos (Mayer, 2006) y aunque son capaces de fagocitar la micobacteria, su función principal es procesar el material antigénico y presentarlo a los linfocitos T para que se activen y proliferen (Baldwin & Telfer, 2015). Las células dendríticas están presentes en gran cantidad en la piel (que cuenta con un tipo especializado de células dendríticas denominadas células de Langerhans) y el revestimiento interior de la nariz, los pulmones, el estómago y los intestinos. Además, están presentes en la sangre en un estado inmaduro (Satthaporn & Eremin, 2001). Los monocitos se producen en la médula ósea y emigran por la sangre hacia diferentes tejidos. Después de permanecer en el torrente sanguíneo alrededor de 24 horas, atraviesan el endotelio de los capilares hacia el tejido conectivo, donde se diferencian rápidamente a macrófagos (Mayer, 2006). En el caso de infección vía aerógena, una vez que la micobacteria ha alcanzado el pulmón, la célula fagocítica por excelencia es el macrófago alveolar, que fagocita la bacteria formando un fagosoma para tratar de eliminarla posteriormente fusionando el fagosoma con un lisosoma, creando un fagolisosoma en cuyo interior se produce la degradación enzimática de la bacteria (Flynn & Chan, 2001). Si este proceso fuese totalmente efectivo se podría neutralizar la infección, pero si no fuese suficiente, la bacteria puede sobrevivir, multiplicarse y provocar la

lisis del macrófago alveolar infectado permitiendo que la infección progrese en el hospedador (Pieters & Gatfield, 2002, Ulrichs & Kaufmann, 2003).

Una vez que se ha producido la lisis del macrófago alveolar infectado, acuden nuevos tipos celulares al foco donde se están replicando las micobacteria para tratar de destruirlas (McNair *et al.*, 2007, Pollock *et al.*, 2005). Los neutrófilos son los leucocitos más abundante de la sangre en el ser humano y son el primer tipo celular implicado en este proceso (Mayer, 2006). Son células que normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo, pero tras el proceso inflamatorio desencadenado por las micobacterias, se desplazan rápidamente al foco de infección, ya que son células muy móviles y capaces de atravesar las paredes de los vasos sanguíneos (Flynn & Chan, 2001). Otro componente celular esencial tras la infección, son las células asesinas naturales (*Natural killer*, NK), que son capaces de destruir directamente la micobacteria y/o los macrófagos infectados para evitar el avance del patógeno. De hecho, se ha relacionado la reducción de la actividad de las células NK con casos de tuberculosis multirresistente en el ser humano (Ratcliffe *et al.*, 1994).

Los linfocitos son una población celular esencial en el control de la infección tuberculosa que se dividen en dos tipos: los linfocitos T, que participan en la respuesta inmune de base celular, y los linfocitos B, que participan principalmente en la respuesta inmune de base humoral (Pollock *et al.*, 2005). Una vez que la micobacteria es captada y presentada por las CPAs, los linfocitos T se diferencian en dos sub-poblaciones principales con base en los receptores que expresen para el complejo mayor de histocompatibilidad, los linfocitos citotóxicos (Tc), también reconocidos como linfocitos T CD8+, y los linfocitos colaboradores o *helper* (Th), también denominados linfocitos T CD4+. A su vez, los linfocitos Th se subdividen en Th1 y Th2 (van Crevel *et al.*, 2002). Los linfocitos B se diferencian en la medula ósea y son los precursores de las células plasmáticas, que serán las encargadas de producir los Ac (Achkar *et al.*, 2015).

Las citoquinas o interleuquinas (IL) son un grupo de proteínas solubles de bajo peso molecular esenciales en la respuesta inmune tras cualquier infección, y en concreto, tras la infección producida por las micobacterias, ya que la producción de un tipo u otro puede ser determinante en la evolución de la enfermedad. Las citoquinas son capaces de regular múltiples funciones sobre diversos tipos celulares, ejerciendo su acción tras unirse a receptores específicos localizados en la superficie de la célula sobre la que actúan (Flynn & Chan, 2001, Scheerlinck, 1999, Scheerlinck & Yen, 2005, Wareham *et al.*, 2014).

Las citoquinas pro-inflamatorias favorecen el desarrollo de la respuesta inflamatoria regulando la activación de diversos tipos celulares para que produzcan nuevas citoquinas, las más importantes en la respuesta inmune frente a la tuberculosis son:

a) **Interferón-gamma** (IFN- γ): citoquina clave en la infección tuberculosa, se produce principalmente por los linfocitos T sensibilizados. Actualmente una de las pruebas diagnósticas oficiales de tuberculosis bovina se basa en la detección *in vitro* del IFN- γ , tras la estimulación previa de la sangre con antígenos específicos del MTBC (Rothel *et al.*, 1992). Su principal papel en la respuesta específica es la activación de los macrófagos, aunque su producción también se relaciona con la síntesis de otras citoquinas de este grupo (Fenton *et al.*, 1997, Flynn *et al.*, 1993). Asimismo, varios estudios han correlacionado una mayor cantidad de IFN- γ con una mayor severidad de las lesiones observadas en animales infectados (Hope *et al.*, 2011, Pollock *et al.*, 2005). Esta citoquina está presente de manera basal en el organismo y su producción puede elevarse en otras infecciones, pero la estimulación con antígenos del MTBC provoca un incremento de la producción de IFN- γ específico en animales infectados o sensibilizados a micobacterias incluidas en el MTBC (Gormley *et al.*, 2006).

b) **Factor de necrosis tumoral alfa** (*tumor necrosis factor*-TNF- α): citoquina producida en gran medida por el grupo de las CPAs. Tiene un papel fundamental en la activación macrofágica e inmunorregulación (Jacobs, 1957, Waters *et al.*, 2003). La deficiencia de esta citoquina se relaciona con una ineficaz formación del granuloma tuberculoso y una elevada carga bacteriana en los animales infectados (Bean *et al.*, 1999, Flynn & Chan, 2001), así como con fenómenos de reactivación de la enfermedad (Chan *et al.*, 2014).

c) **IL-1 β** : producida por macrófagos, monocitos y células dendríticas en respuesta al TNF- α . Presenta múltiples funciones (acciones estimuladoras e inhibitorias sobre diversos tipos celulares, y también induce la apoptosis celular). Su carencia origina multiplicación bacteriana y alteraciones en la formación de los granulomas (Coad *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2010b), favoreciendo la replicación bacteriana y el avance de la infección.

d) **IL-6**: producida por linfocitos Th2, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. Posee propiedades pro y anti-inflamatorias, participa en fenómenos de inflamación, hematopoyesis y diferenciación de los linfocitos T. Puede inhibir la producción de TNF- α e IL-1 β , y por otro su deficiencia aumenta la susceptibilidad a la infección debido a una deficiente producción de IFN- γ específico por parte del animal (Xu *et al.*, 2007). Se ha aislado en elevadas cantidades en suero y en esputo de pacientes con tuberculosis clínica (Zeng *et al.*, 2015) y se ha relacionado con mayor resistencia a la enfermedad en especies como el cebú (Vordermeier *et al.*, 2012).

e) **IL-12**: producida por linfocitos Th y actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T (aumentando la producción de IFN- γ específico). La IL-12 induce la formación de todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos y activa la proliferación de linfocitos B (Waters *et al.*,

2003). La determinación de sus niveles basales se correlaciona con el grado de protección alcanzado por diversas vacunas experimentales frente a la tuberculosis (Chen *et al.*, 2014).

f) **IL-15**: producida por una amplia variedad de células (células epiteliales, monocitos, miocitos, hepatocitos y células del parénquima pulmonar). Junto con la IL-2 contribuye a la activación y proliferación de linfocitos T y células NK (Perera *et al.*, 2012, Roy *et al.*, 2008) y también participa en la diferenciación de monocitos a macrófagos. Sus niveles basales varían en individuos que presentan simultáneamente infección tuberculosa y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o únicamente infección tuberculosa (Hogg *et al.*, 2011). Su producción se relaciona con la IL-32 y con la asimilación de la vitamina D (Montoya *et al.*, 2014).

g) **IL-17**: producida por los linfocitos Th y se induce su regulación por la IL-23. Es una citoquina que actúa como mediador en las reacciones de inflamación retardada. Recluta neutrófilos y monocitos en el foco de la inflamación (Jones *et al.*, 2010b). Se ha demostrado que sus niveles basales se encuentran disminuidos en individuos infectados que presentan tuberculosis activa y lesiones tuberculosas de tipo cavitario, excretando el bacilo en elevadas cantidades (Fan *et al.*, 2015, Wareham *et al.*, 2014).

h) **IL-18**: producida por las células adrenales y células de Kupffer. Su función biológica está estrechamente relacionada con la IL-12, ya que posee la misma capacidad de inducción de IFN- γ específico en linfocitos T y células NK (Jacobs, 1957). Esta citoquina se encuentra también implicada en infecciones provocadas por otros agentes infecciosos intracelulares como *Leishmania* (Kumar *et al.*, 2014). Se ha sugerido que la presencia de polimorfismo en el gen que regula su secreción se relaciona con un mayor riesgo de tuberculosis en humanos (Li *et al.*, 2013).

i) **IL-32**: citoquina identificada en el ser humano que regula la activación y diferenciación de monocitos a macrófagos (Netea *et al.*, 2008), la producción de otras citoquinas (Nold *et al.*, 2008) y la proliferación de varios tipos celulares. Se encuentra en elevados niveles en pacientes con tuberculosis en fase latente comparado con aquellos sanos o que padecen la enfermedad. Recientemente se ha observado una correlación entre los niveles de IL-32 y la vitamina D (conversión de 25D a 1,25D) que facilita la actividad antimicrobiana de varios péptidos (Montoya *et al.*, 2014). Se cree que esta citoquina logra inactivar la micobacteria mediante mecanismos dependientes de vitamina D (Fabri *et al.*, 2011).

Las citoquinas anti-inflamatorias impiden el desarrollo de la respuesta inflamatoria ya que son capaces de inhibir la síntesis y la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias, las más importantes en la respuesta inmune frente a la tuberculosis son:

a) **Factor de crecimiento transformante beta** (*transforming growth factor-TGF- β*): producida principalmente por los linfocitos T y las plaquetas. Se la relaciona con el daño tisular y la fibrosis que se origina en las lesiones tuberculosas. El TGF- β también altera la presentación del antígeno y disminuye la producción de IFN- γ específico por parte de los linfocitos Th1 (Hernández-Garay & Méndez-Samperio, 2003, Toossi & Ellner, 1998). Además, disminuye la diferenciación de los linfocitos Th1 (Hirsch *et al.*, 1997).

b) **IL-4**: producida por los linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea y por determinadas subpoblaciones de células NK. Suprime la producción de IFN- γ específico y evita la activación de los macrófagos (Toossi & Ellner, 1998). En un principio se creyó que su presencia se correlacionaban con la formación de lesiones granulomatosas, aunque estudios posteriores concluyeron que no era posible asociar la presencia o ausencia de esta citoquina con presencia y/o ausencia de lesiones granulomatosas (Flynn & Chan, 2001).

e) **IL-10**: producida principalmente por linfocitos Th2, macrófagos, linfocitos B y queratinocitos. Antagoniza la respuesta pro-inflamatoria disminuyendo la producción de IFN- γ específico, TNF- α , IL-2 e IL-12 y favoreciendo la progresión de la infección (Waters *et al.*, 2003). Un estudio reciente ha comprobado que puede existir cierto grado de polimorfismo en el gen que regula la secreción de esta citoquina asociado con una susceptibilidad a la infección tuberculosa en función de la raza en el ser humano (Liu *et al.*, 2015).

1.2.3. Respuesta inmune adquirida

La respuesta inmune adquirida requiere de un primer contacto con el antígeno para que se desarrolle la memoria inmunológica (Kindt *et al.*, 2007), de esta manera en caso de reinfección, la respuesta inmune se desencadena en el hospedador de una forma más rápida. Este tipo de inmunidad puede desarrollarse de forma natural durante la propia infección (inmunidad activa), o bien mediante transferencia de Ac durante la gestación (Halliday, 1985) y/o al ingerir el calostro (inmunidad pasiva). También puede adquirirse de forma artificial, ya sea mediante vacunación (inmunidad activa) o mediante sueroterapia (inmunidad pasiva). El control de la infección depende fundamentalmente del éxito de la interacción entre las CPAs y los linfocitos T, determinante para su diferenciación y proliferación (Flynn & Chan, 2001, van Crevel *et al.*, 2002).

Tras la infección, se diferencian dos tipos de repuesta inmune implicadas para contener el avance del patógeno, siendo la primera de base celular (mediada por linfocitos T principalmente), y la segunda de base humoral (mediada por Ac). Hasta la fecha, no ha sido posible definir con exactitud el inicio y el fin de ambas respuestas, ya que este parámetro

depende de multitud de factores ajenos al sistema inmune del hospedador (Palmer, 2007a, Pollock *et al.*, 2005, Ritacco *et al.*, 1991). Se podría considerar que el tiempo medio necesario para que un animal infectado desarrolle una respuesta inmune detectable es de 41 días (Álvarez *et al.*, 2014a) aunque es necesario tener en cuenta que entre otros factores, influye la prueba diagnóstica seleccionada para valorar esa respuesta, ya que como se comentará más adelante en el apartado de diagnóstico de la tuberculosis en rumiantes y camélidos de Sudamérica, hay pruebas que son capaces de detectar más precozmente los animales recién infectados. Sin embargo también se ha descrito que este periodo puede variar desde los 14 hasta los 119 días en estudios consultados en animales infectados de forma natural (Conlan *et al.*, 2012, Kao *et al.*, 1997, Perez *et al.*, 2002) e infectados de forma experimental (Costello *et al.*, 1998, Dean *et al.*, 2005, Neill *et al.*, 1989, Neill *et al.*, 1991). La principal diferencia observada entre ambos grupos de animales es que, por norma general, los estudios que emplean modelos de infección experimental son más precisos ya que se conoce el momento exacto de la infección y la dosis empleada. Sin embargo, en estos modelos se suele emplear dosis infectivas más elevadas que las que intervienen en la infección natural, factor que puede alterar la precocidad y la duración de la respuesta inmune desencadenada en el hospedador, respecto a los parámetros observados en condiciones de campo (Szmaragd *et al.*, 2012).

1.2.3.1. Respuesta inmune de base celular

En la tuberculosis, la respuesta inmune más relevante es la de base celular (inmunidad mediada por células: IMC), en la que el principal tipo celular implicado son los linfocitos T (Baldwin *et al.*, 2015). La IMC es de mayor intensidad en las primeras fases tras la infección, y su eficacia se correlaciona directamente con la capacidad protectora frente a la tuberculosis (Flynn & Chan, 2001, Neill *et al.*, 1994b, Pollock & Neill, 2002). Los linfocitos T se diferencian en dos poblaciones: Th (CD4+) y Tc (CD8+) que participan activamente en la respuesta inmune (Jasenosky *et al.*, 2015, Lin & Flynn, 2015). En animales infectados de manera experimental con *M. bovis* se ha observado que los linfocitos T CD4+ son la principal población celular productora de IFN- γ (responsable de la activación de los macrófagos), mientras que los linfocitos T CD8+ son los responsables de lisar las células infectadas (Liébana *et al.*, 1999), para evitar el avance de la infección.

Como ya se ha comentado anteriormente, los linfocitos Th se diferencian en dos poblaciones (Th1 y Th2). Desde el punto de vista de la protección frente la tuberculosis los linfocitos Th1 son los más importantes (Robinson *et al.*, 2015), pues se caracterizan por inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias necesarias para incrementar la actividad macrófaga y poder así contener la infección. Sin embargo, la población de linfocitos Th2 induce la producción de citoquinas anti-inflamatorias y reduce la actividad macrófaga, favoreciendo la evolución hacia una respuesta de tipo humoral, y que, por tanto, la enfermedad

progrese (McNair *et al.*, 2007). En pacientes con infección natural se ha observado como la respuesta de la población Th1 aparece disminuida en presencia de lesiones tuberculosas de tipo cavitarias (Fan *et al.*, 2015), dato que también se ha observado en ganado caprino infectado de forma natural (Sánchez *et al.*, 2011) y ganado bovino infectado de manera experimental (Palmer *et al.*, 2007). El balance entre las dos poblaciones de linfocitos Th (Th1/Th2) será, por tanto, el que determine la evolución de la infección (da Silva *et al.*, 2015, Flynn & Chan, 2001, Pollock & Neill, 2002, Pollock *et al.*, 2005, Surcel *et al.*, 1994).

La IMC se mantiene aproximadamente entre 6 y 8 meses tras la infección (Pollock *et al.*, 2005), no habiéndose definido con exactitud el periodo de duración. En un estudio realizado en ganado bovino infectado de manera experimental se ha descrito que la respuesta de base celular se manifiesta entre 15 y 29 días tras la infección (Waters *et al.*, 2012a), siendo detectable por la prueba IDTB aproximadamente cuatro semanas tras la infección (Bezós *et al.*, 2014b) y por el test de detección de IFN- γ desde la segunda semana tras la infección, en ganado bovino (Buddle *et al.*, 1995) y caprino (Bezós *et al.*, 2010).

1.2.3.2. Respuesta inmune de base humoral

La respuesta inmune de base humoral no es relevante en las primeras fases tras la infección desde el punto de vista de la protección, ya que al igual que ocurre con otros patógenos intracelulares, las micobacterias permanecen en el interior de los macrófagos donde el acceso de los Ac es más difícil, imposibilitando su destrucción (Flynn & Chan, 2001). Es una respuesta que adquiere mayor intensidad conforme la infección avanza (Pollock *et al.*, 2001) y que se asocia con el desarrollo de lesiones en el hospedador (Pollock *et al.*, 2005, Waters *et al.*, 2014a, Welsh *et al.*, 2005). A medida que la respuesta de base celular disminuye, se produce un cambio en el dominio de la población de linfocitos, siendo predominante la población de linfocitos Th2 (Surcel *et al.*, 1994). Este hecho se asocia con la disminución y/o anergia de la respuesta celular y con el incremento en la producción por parte de las células plasmáticas de Ac específicos frente a la micobacteria (McNair *et al.*, 2007, Ritacco *et al.*, 1991, Welsh *et al.*, 2005), por lo que de manera genérica el título elevado de Ac se considera detectable en fases avanzadas de la infección (Pollock *et al.*, 2001, Pollock & Neill, 2002, Schiller *et al.*, 2010b). Además, en un estudio realizado por Waters y colaboradores, en ganado bovino infectado de manera experimental, el título de Ac fue detectable cuatro semanas tras la infección (Waters *et al.*, 2006b).

El principal Ac implicado en la respuesta inmune de base humoral frente a la tuberculosis es la inmunoglobulina G (IgG), además se ha demostrado que existe correlación entre los niveles de IgG y el grado de lesiones desarrolladas en el hospedador (Khatri *et al.*, 2012, Welsh *et al.*, 2005), no observándose esta correlación entre los niveles de IgG y la progresión de la enfermedad. La IgG se subdivide en varios tipos celulares, siendo IgG1 e

IgG2 los que han mostrado mayor relevancia en la tuberculosis, especialmente el IgG1 (Welsh *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Lightbody y colaboradores, en animales infectados de forma natural y experimental se observó cómo los niveles de IgG1 eran superiores en los animales que presentaron mayor grado de lesiones y en aquellos animales que habían sido previamente sensibilizados con antígenos específicos del MTBC (Lightbody *et al.*, 2000).

En relación a la evolución de la respuesta inmune desencadenada en el hospedador tras la infección, se ha sugerido que la dosis infectiva podría ser decisiva, ya que se comprobó que dosis infectivas altas provocaban una moderada IMC y una rápida aparición de Ac circulantes frente a *M. bovis*, mientras que dosis bajas provocaban una IMC más gradual y una escasa o ausente respuesta de base humoral (Pollock & Neill, 2002). Este hecho podría justificar que en determinadas situaciones animales infectados desarrollasen una IMC moderada, pudiendo ser clasificados de manera errónea como negativos con las pruebas diagnósticas de base celular (Álvarez *et al.*, 2014a, Humblet *et al.*, 2009) y, sin embargo, podrían ser correctamente detectados empleando pruebas que detectan la respuesta de base humoral (Neill *et al.*, 1994b, Plackett *et al.*, 1989, Pollock *et al.*, 2001). En estas circunstancias se pondría de manifiesto la utilidad potencial de las pruebas serológicas como pruebas diagnósticas complementarias para su empleo puntual.

El conocimiento de la respuesta inmune de base humoral frente a las micobacterias podría abrir un camino para el desarrollo de nuevos protocolos de diagnóstico (Jee *et al.*, 2008), ya que los Ac parecen tener un papel importante en la latencia y evitando la reactivación de la enfermedad (Achkar *et al.*, 2015, Chan *et al.*, 2014). En estudios experimentales se ha estimado que el título de Ac en animales infectados es detectable entre dos y seis meses tras la infección y puede durar hasta dos años tras la misma (Waters *et al.*, 2006b, Welsh *et al.*, 2005), aunque no se ha definido con exactitud la duración. Se ha demostrado, además, que la precocidad de la respuesta de base humoral puede verse modificada en función del antígeno del MTBC hacia el que se detectan los Ac. Por ejemplo, en caso de identificar Ac específicos frente al antígeno MPB83, el título es detectable entre tres y cuatro semanas tras la infección (O'Loan *et al.*, 1994, Waters *et al.*, 2006b). Sin embargo, al valorar el empleo de pruebas de base humoral que detectan Ac específicos frente a los antígenos ESAT-6 y MPB70, se ha descrito que el título es detectable entre 12 semanas y hasta 20 meses tras la infección (Fifis *et al.*, 1992, Lyashchenko *et al.*, 1998).

1.2.4. Evolución del estatus del hospedador tras la infección

En el caso de la tuberculosis es necesario diferenciar los conceptos infección y enfermedad, ya que no todos los animales infectados llegan a padecer el proceso clínico. La evolución de la respuesta inmune tras la infección difiere en función de diversos factores propios y ajenos al huésped (Humblet *et al.*, 2009), por este motivo es complejo definir las

fases que pueden tener lugar en el hospedador tras la infección tuberculosa, habiendo multitud de estadios intermedios entre el animal sano, el animal infectado y el animal infeccioso. El periodo de tiempo estimado para que de manera natural, un animal infectado se considere infeccioso, se estima de media 21 meses, aunque algunos trabajos han indicado valores más elevados (hasta de 34 meses) (Álvarez *et al.*, 2014b), y en otros este periodo se ha limitado a 87 días (Neill *et al.*, 1991). De manera general, se asume que el riesgo de transmisión es mínimo en las primeras fases tras la infección del animal, ya que en los estadios iniciales todavía no se ha formado la lesión, (Griffin & Dolan, 1995). Aumentando la carga bacilar a medida que la infección avanza y el desarrollo de lesiones progresa en el hospedador (McCorry *et al.*, 2005, Olea-Popelka *et al.*, 2008, Welsh *et al.*, 2005).

En base a la respuesta a las pruebas diagnósticas de tuberculosis, el primer estadio contemplado tras la infección es el de animal no reactor. En este estadio el hospedador está recién infectado, por lo que el sistema inmune necesita un tiempo mínimo para que se establezca la respuesta para contener el patógeno (denominado coloquialmente periodo de pre-alergia) (Pollock & Neill, 2002). La evolución de este estadio depende en gran medida del estado del sistema inmune del hospedador. Se ha descrito que en condiciones de latencia en las que la lesión tuberculosa se encuentra encapsulada, aunque el sistema inmune es competente la respuesta que produce no es detectable porque como la micobacteria está aislada, el sistema inmune no recibe suficiente estímulo antigénico (Lamont, 1947, Olea-Popelka *et al.*, 2008).

El siguiente estadio considerado tras la infección es el de animal reactor, en el cual el sistema inmune del hospedador ya ha reconocido al agente patógeno (Pollock & Neill, 2002). En este estadio, que el hospedador sea positivo o no a las pruebas diagnósticas depende en gran parte de la capacidad que estas presenten para detectar animales infectados y del momento de realización de las mismas (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994). Se podría considerar que un animal es infeccioso, cuando el sistema inmune del hospedador no ha sido capaz de contener al patógeno, este ha logrado sobrevivir y replicarse desarrollando lesiones tuberculosas de extensión variable en el hospedador (Welsh *et al.*, 2005). El animal infeccioso es capaz de excretar la bacteria de manera intermitente (Neill *et al.*, 1989) y en función del momento de realización de las pruebas diagnósticas puede ser reactor o no a las mismas. Para comprender las fases de la infección tuberculosa es necesario tener en cuenta dos conceptos: el de anergia y el de latencia.

Concepto de anergia: el término anergia se ha definido como aquel estado en el cual un animal infectado no responde a las pruebas diagnósticas de base celular (Lepper *et al.*, 1977b). Sin embargo, sí podría presentar niveles detectables de Ac circulantes, siendo positivo a las pruebas de base humoral (Neill *et al.*, 1994b, Plackett *et al.*, 1989). Se desconoce con exactitud el mecanismo inmunológico que ocasiona este proceso, pero en el ser humano

se ha relacionado con niveles elevados de IL-10, que inhibe los linfocitos T, disminuyendo la producción de IFN- γ (Boussiotis *et al.*, 2000).

Es un fenómeno que se ha descrito sobretodo en fases avanzadas de la enfermedad, cuando los animales presentan lesiones tuberculosas extensas (Amadori *et al.*, 2002, Fifiis *et al.*, 1994, Ritacco *et al.*, 1990, Waters *et al.*, 2006b), en situaciones de agotamiento del sistema inmune (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b), debido a infecciones concomitantes como la diarrea vírica bovina (BVD) u otras enfermedades (Monies & Head, 1999) y cuando el sistema inmune del hospedador está comprometido, como por ejemplo en animales de edad avanzada (Brooks-Pollock *et al.*, 2013) y en casos de malnutrición (Francis, 1947). En animales de elevada producción, la anergia se puede relacionar con situaciones de estrés (el transporte o el manejo), el desequilibrio metabólico postparto (Kehrli *et al.*, 1989) y también se ha descrito en situaciones puntuales debido a un tratamiento sistémicos con corticosteroides (Doherty *et al.*, 1995b). Desde un punto de vista epidemiológico es esencial detectar los animales anérgicos, ya que al no reaccionar a las pruebas diagnósticas de base celular permanecen en la explotación y podrían constituir fuente de infección para los animales sanos (McCorry *et al.*, 2005, McNair *et al.*, 2007, Pollock *et al.*, 2005, Plackett *et al.*, 1989).

La anergia es por tanto un fenómeno difícil de caracterizar, ya que sería necesario realizar de forma paralela a la prueba diagnóstica un análisis mediante el cual se pueda asegurar que la respuesta celular desarrollada en el hospedador no es competente. No se debe confundir el término de anergia con el concepto de falso negativo, que puede aparecer en las pruebas de base celular debido a limitaciones inherentes a las mismas, o a una incorrecta interpretación y/o realización.

Concepto de latencia: el término de latencia se define como un estado en el que tras la infección, la micobacteria es capaz de permanecer viable en el granuloma tuberculoso durante un periodo prolongado de tiempo en el hospedador (Merchand *et al.*, 1999, Yuan *et al.*, 1998). Durante dicho estado el bacilo está en estado quiescente, en el cual la replicación celular se ve disminuida (Rittershaus *et al.*, 2013), por lo que no existe progresión de la enfermedad (Parrish *et al.*, 1998). Varios estudios han descrito que el fenómeno de la latencia se produce cuando la micobacteria es capaz de evadir la formación del fagolisosoma y sobrevivir en el hospedador, evitando que el hospedador lo elimine por completo (Olsen *et al.*, 2010, Pieters & Gatfield, 2002). En el ser humano también se ha relacionado la aparición de este estado con una mayor rapidez en la activación y diferenciación de las células implicadas en la respuesta inmune (Brighenti & Andersson, 2012, Urdahl *et al.*, 2011).

En el ganado doméstico, el estado de latencia apenas se ha considerado porque durante el mismo el riesgo de transmisión es nulo (Pollock & Neill, 2002). Sin embargo, es esencial tener en cuenta que en determinadas circunstancias podría producirse una reactivación de la infección debido a una inmunosupresión por infecciones concurrentes

(Ameni *et al.*, 2007, Humblet *et al.*, 2009), al tratamiento con fármacos inmunosupresores (Brown *et al.*, 1998), malnutrición (Griffin *et al.*, 1993b) o a un desequilibrio metabólico (Doherty *et al.*, 1995b) y el animal podría desarrollar tuberculosis clínica, incrementando la excreción de la micobacteria (McCorry *et al.*, 2005).

En el ser humano, se estima que más de dos billones de personas presentan infección latente por *M. tuberculosis*, de los cuales aproximadamente el 5-10% padecerá la enfermedad clínica [3-5% en los primeros dos años tras la infección mientras que el 2-5% desarrollará tuberculosis en algún otro momento de su vida (LoBue *et al.*, 2010, North & Jung, 2004)]. En el caso de que exista inmunocompromiso del sistema inmune (confección con el virus del VIH, diabetes mellitus y/o tratamientos inmunosupresores), la probabilidad de desarrollar la forma activa es significativamente superior, alcanzando el 8-18% (Subbian *et al.*, 2012). La latencia puede persistir durante muchos años sin que exista una activación de la enfermedad, de hecho es posible recuperar bacilos viables en individuos infectados que fallecieron por otras causas no relacionadas con tuberculosis (Barry *et al.*, 2009).

1.2.5. Vacunación como estrategia para el control de la tuberculosis bovina

El empleo experimental de la vacuna *M. bovis* BCG en ganado bovino ha mostrado una gran variabilidad de resultados obtenidos (Waters *et al.*, 2012b), siendo la principal limitación que presenta su uso, la dificultad para diferenciar animales infectados de aquellos vacunados (Andersen *et al.*, 2000, Garnier *et al.*, 2003, Vordermeier *et al.*, 2000). Además, la vacunación frente a tuberculosis podría ser una estrategia alternativa para el control de la enfermedad en animales silvestres, ya que en estas especies no es viable implantar campañas de erradicación basadas en el diagnóstico y sacrificio de los animales positivos (Buddle *et al.*, 2013a, Gortázar *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha demostrado que la administración de *M. bovis* BCG en aquellas especies silvestres consideradas reservorios de tuberculosis, ha reducido la prevalencia de la enfermedad en ellas y en el ganado bovino en contacto (Gormley & Corner, 2013a, Palmer *et al.*, 2014).

Actualmente en Europa la vacunación del ganado bovino frente a la tuberculosis es una práctica prohibida, de acuerdo con la Directiva Europea 78/52/CEE. Si bien es cierto que algunos países contemplan esta práctica como una futura estrategia para favorecer la erradicación de la enfermedad. Independientemente de la situación individual de cada país, es importante aunar esfuerzos en materia de diagnóstico, con el fin de garantizar la seguridad animal y permitiendo el comercio de ganado bovino entre los distintos países europeos. La mayor parte de los estudios realizados en materia de vacunación han empleado la *M. bovis* BCG como candidata, pero en la actualidad se están desarrollando cada vez más alternativas a partir de *M. bovis* así como de otras especies del MTBC.

1.2.5.1. Vacuna *M. bovis* BCG

La cepa original de *M. bovis* BCG se desarrolló en 1921 en el Instituto Pasteur, a partir de la micobacteria aislada de una vaca con mastitis, a la cual se sometió a un proceso de atenuación realizando cultivos sucesivos aproximadamente cada tres semanas durante 13 años [se estima que el número de pases realizados fue de 230 (Calmette *et al.*, 1926)]. Su nombre se debe a los dos investigadores que llevaron a cabo el proceso de atenuación de la misma: el médico Albert Calmette (1863-1933) y el veterinario Camille Guérin (1872-1961). De la cepa original se han mantenido subcultivos durante décadas, produciéndose una deriva genética que ha originado diferentes cepas vacunales (Grange *et al.*, 1983, Oettinger *et al.*, 1999). En función de su crecimiento, la multiplicación en el punto de inoculación y la diseminación, se clasifican en cepas fuertes (Pasteur y Copenhagen) y cepas débiles (Glaxo) (OMS, 2012). El proceso de atenuación de *M. bovis* BCG provocó entre otros, la delección de ciertos genes asociados a factores de virulencia localizados en la región RD1 del genoma (Mahairas *et al.*, 1996), que en ocasiones también se ha relacionado con la pérdida de eficacia protectora de larga duración tras la vacunación (Brosch *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, *M. bovis* BCG es la única vacuna comercializada contra la tuberculosis (Checkley & McShane, 2011), su eficacia es variable en el ser humano (Andersen & Woodworth, 2014b) y en el ganado doméstico (Waters *et al.*, 2012b), por lo que se continúa trabajando en el desarrollo de nuevas alternativas que la superen en eficacia y seguridad. En el hombre, ha demostrado que previene la tuberculosis diseminada en niños aunque no previene la tuberculosis pulmonar en todos los rangos de edad (Andersen & Kaufmann, 2014a). A pesar de estas limitaciones, la vacunación con *M. bovis* BCG reduce la mortalidad infantil por tuberculosis (Benn *et al.*, 2013), motivo por el cual se sigue empleando en el ser humano.

Desde el desarrollo de la vacuna *M. bovis* BCG se viene planteando la posibilidad de su empleo en animales para controlar la tuberculosis (Buddle *et al.*, 1995, Buddle *et al.*, 2003a, Buddle *et al.*, 2002, Díaz-Otero *et al.*, 2008, Vordermeier *et al.*, 2006, Vordermeier *et al.*, 2014). Existen diversos estudios realizados en animales infectados de manera experimental con el fin de valorar la eficacia de *M. bovis* BCG, y aunque difieren en función de la cepa vacunal, la vía de infección y la dosis infectiva empleadas (Vordermeier *et al.*, 2014), la principal conclusión que se puede extraer es que *M. bovis* BCG no evita la infección pero sí logra disminuir el desarrollo de las lesiones en el hospedador, lo que se asocia con una menor excreción de la micobacteria y una menor tasa de transmisión (Buddle *et al.*, 2008, Hope & Villarreal-Ramos, 2008, Vordermeier *et al.*, 2014). Además, al comparar distintas cepas de *M. bovis* BCG se observó que el grado de protección frente a la enfermedad desarrollada en ganado bovino fue similar (Hope *et al.*, 2011, Wedlock *et al.*, 2008). Asimismo, se ha descrito que la vacunación de animales jóvenes (uno o dos días tras al nacimiento o hasta los dos

meses) confiere una mayor protección contra la enfermedad (Buddle *et al.*, 2003b, Hope *et al.*, 2005a) y que la vacunación con *M. bovis* BCG por vía sistémica o empleando otras como la oral o la endobronquial, confiere un grado similar de protección independientemente de la vía empleada (Buddle *et al.*, 2005). Además, en ganado bovino también se ha descrito que la protección desarrollada en el hospedador tras la vacunación con *M. bovis* BCG difiere en función de la raza, siendo superior en razas puras de Cebú que en cruces industriales (Ellwood & Waddington, 1972).

Otra incógnita acerca del empleo de la vacuna *M. bovis* BCG es la duración de la protección que desarrolla en el hospedador. En un estudio realizado en animales infectados de forma experimental, Thom y colaboradores, observaron que la protección originada tras la vacunación tenía una duración estimada de un año (Thom *et al.*, 2012), mientras que en otro estudio realizado en Etiopía en condiciones naturales, se concluyó que el grado de protección observado fue de 22 meses (Ameni *et al.*, 2010). También se ha descrito que la primo vacunación con *M. bovis* BCG seguida de la administración de vacunas de subunidades en las que se incluyen compuestos antigénicos presentes en *M. bovis* BCG, confiere una protección de mayor duración frente a la enfermedad (Vordermeier *et al.*, 2014). Obteniendo también resultados similares cuando se evaluó el empleo de *M. bovis* BCG tanto para la primo vacunación como para la revacunación (Wedlock *et al.*, 2008).

La mayor parte de los trabajos realizados sobre la vacunación con *M. bovis* BCG en ganado bovino se han realizado de forma experimental, sin embargo en estudios con *M. bovis* BCG llevados a cabo en México o Etiopía en condiciones naturales de infección, se ha sugerido que la vacunación podría inducir una mayor protección cuando la infección se produjo de forma natural que en infección experimental (Ameni *et al.*, 2010, Lopez-Valencia *et al.*, 2010), debido a que en infecciones naturales la dosis infectiva suele ser menor que la empleada en infecciones experimentales. Es necesario tener en cuenta otros factores tales como la exposición previa a otras micobacterias, ya que se ha descrito que la infección con bacterias del complejo MAC o del grupo MOTT previamente a la vacunación con *M. bovis* BCG puede conferir cierto grado de protección frente a la enfermedad (Buddle *et al.*, 2005, Thom *et al.*, 2008). Sin embargo también se ha descrito que *M. bovis* BCG desarrolla en el hospedador una menor protección cuando los animales han estado previamente en contacto con micobacterias ambientales (Brandt *et al.*, 2002), siendo necesario realizar más trabajos científicos al respecto para dilucidar este aspecto.

Los animales vacunados con *M. bovis* BCG se sensibilizan y reaccionan positivamente a las pruebas diagnósticas oficiales, siendo difícil diferenciarlos de infectados. Varios estudios parecen indicar que esta interferencia tiene carácter temporal, y que puede durar hasta seis meses tras la vacunación (Whelan *et al.*, 2011). Sin embargo no se ha podido correlacionar una mayor o menor protección frente a la enfermedad en función de la interferencia observada en la prueba IDTB ni determinar si la duración de la interferencia se relaciona con la duración

de la protección en el hospedador (Whelan *et al.*, 2011). Además, el empleo de protocolos que contemplen una primo vacunación y una revacunación anual, produciría posibles interferencias diagnósticas durante toda la vida productiva de los animales (Vordermeier *et al.*, 2011, Vordermeier *et al.*, 2014, Waters *et al.*, 2012b).

Para evitar o minimizar la interferencia diagnóstica, se vienen desarrollando reactivos alternativos para el diagnóstico que sustituyan a las PPDs y que contengan antígenos presentes en la cepa infecciosa y ausentes en *M. bovis* BCG. Es la base de la estrategia *Differentiate Between Infected and Vaccinated Animals* (DIVA), que permitiría discriminar si la respuesta positiva se debe a una infección o a una vacunación (Vordermeier *et al.*, 2000, Vordermeier *et al.*, 2001, Vordermeier *et al.*, 2009, Vordermeier *et al.*, 2011). Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 se emplean prácticamente de manera generalizada en el test de detección de IFN- γ , ya que están presentes en *M. bovis* y *M. caprae* y ausentes en *M. bovis* BCG, el complejo MAC y la mayoría de las micobacterias del grupo MOTT. Otros candidatos que han demostrado potencial diagnóstico tanto en la prueba IDTB como en el test de detección de IFN- γ son Rv3615c (Sidders *et al.*, 2008) y Rv3020c (Jones *et al.*, 2010a, Jones *et al.*, 2012, Whelan *et al.*, 2010a).

1.2.5.2. Vacunas alternativas a *M. bovis* BCG

En las últimas décadas varios laboratorios se han propuesto desarrollar una alternativa a la vacuna *M. bovis* BCG (Andersen & Woodworth, 2014b, Checkley & McShane, 2011, Flynn, 2004, Waters *et al.*, 2012b, Weiner & Kaufmann, 2014) a partir de distintas cepas de *M. bovis* y de otras especies del MTBC. Según el informe de la OMS de 2010, en la actualidad existen diez candidatas a vacunas contra la tuberculosis en avanzado estado de desarrollo preclínico o en ensayos clínicos (fase I o II) con distintas estrategias, bien para mejorar la eficacia de *M. bovis* BCG (vacunas de subunidades) o bien para sustituirla (vacunas vivas), con el objetivo de que para el año 2020 se logre autorizar al menos una nueva vacuna contra la tuberculosis (OMS, 2010).

Para su potencial uso en el ganado bovino, las alternativas a la vacuna *M. bovis* BCG obtenidas a partir de *M. bovis* más relevantes, son cepas atenuadas identificadas en animales y consideradas como de elevada virulencia, o cepas de *M. bovis* inactivadas mediante distintos procesos. En concreto, el empleo de una cepa de *M. bovis* de campo atenuada mediante irradiación, demostró conferir niveles de protección similares a los obtenidos empleando la vacuna *M. bovis* BCG en ganado bovino (Waters *et al.*, 2011b). De manera adicional, en fauna silvestre se han realizado diversos ensayos con una vacuna inactivada obtenida a partir de una cepa de *M. bovis* de campo. Los resultados obtenidos indican que en los animales vacunados la proporción de lesiones observadas fue inferior a las identificadas en aquellos animales que no habían sido vacunados (Beltrán-Beck *et al.*, 2012, Beltrán-Beck

et al., 2014a). Con el fin de corroborar estos resultados es necesario realizar más estudios en condiciones de campo, ya que estos agentes podrían inducir una mayor protección en condiciones naturales que en animales infectados de forma experimental, tal y como se ha observado en ganado bovino en ensayos realizados con *M. bovis* BCG.

El desarrollo de una vacuna inactivada eficaz supondría múltiples ventajas respecto a *M. bovis* BCG. Ciertos autores defienden que la interferencia diagnóstica sería menor que la originada por una cepa atenuada, como se ha observado con la vacuna inactivada frente a paratuberculosis (Garrido *et al.*, 2013). Además, el uso de una formulación inactivada es más seguro, ya que se evitan posibles reversiones de la virulencia, hecho que se ha descrito de manera puntual en humanos inmunodeprimidos al emplear *M. bovis* BCG (Mignard *et al.*, 2006). Por último, la estabilidad de una vacuna inactivada es mayor que la de una viva (Beltrán-Beck *et al.*, 2014a), lo que permite implementar otros sistemas de administración como la vía oral, de gran utilidad en fauna silvestre, ya que se evita la necesidad de capturarlos (Ballesteros *et al.*, 2009a, Ballesteros *et al.*, 2009b).

M. tuberculosis es otro candidato importante dentro del complejo MTBC para el desarrollo de vacunas frente a la tuberculosis. En cobayas y ratones infectados de manera experimental y en ganado caprino infectado de manera natural, se ha evaluado la protección frente a la infección empleando una vacuna compuesta por fracciones celulares de *M. tuberculosis*, confiriendo a los animales una adecuada protección frente a la enfermedad (Arbues *et al.*, 2013, Domingo *et al.*, 2009, Vilaplana *et al.*, 2011). De las vacunas que actualmente se están evaluando como posibles sustitutos a *M. bovis* BCG, la vacuna *M. tuberculosis* SO2 es la primera vacuna desarrollada a partir de una cepa viva atenuada de *M. tuberculosis*, además a partir de esta se ha obtenido la vacuna MTBVAC, que actualmente se encuentra en fase clínica en humanos.

M. tuberculosis SO2, es una vacuna viva atenuada obtenida a partir de la cepa *M. tuberculosis* MT103 modificada genéticamente, que presenta dos delecciones independientes no reversibles, y no contiene marcadores de resistencia frente a antibióticos (Cardona *et al.*, 2009, Martín *et al.*, 2006). Mediante la doble delección, se ha logrado eliminar genes de virulencia y lípidos que interfieren en la respuesta desarrollada por el sistema inmune. La doble delección consiste en eliminar parte del gen *PhoP* con el fin de atenuar la cepa, ya que se disminuye la expresión de un gran número de genes implicados en la virulencia, al tiempo que se activa su inmunidad (al inactivar la producción de lípidos complejos que alteran la respuesta inmune) (Pérez *et al.*, 2001). Además también se elimina el gen *fadD26*, responsable de la síntesis del lípido presente en la cobertura exterior de la bacteria, también implicado en la virulencia de *M. tuberculosis* (Camacho *et al.*, 2001), aunque en menor medida que el gen *PhoP*.

La característica más relevante de esta atenuación presente en *M. tuberculosis* SO2 es la pérdida del sistema ESX-1, responsable de la producción de los antígenos principales

que estimulan la respuesta inmune de base celular (ESAT-6 y CFP-10) (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2008). Por este motivo, todas las proteínas en cuya regulación está implicada la región atenuada se expresan de manera reducida, por lo que sería posible contemplar la posibilidad de que los antígenos en uso en la estrategia DIVA para la *M. bovis* BCG pudieran servir también para diferenciar animales vacunados con *M. tuberculosis* SO2 de aquellos infectados de forma natural. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios en ganado doméstico para valorar la interferencia diagnóstica producida con la vacuna *M. tuberculosis* SO2. En trabajos científicos desarrollados en ratones y cobayas, se comprobó que cepas de *M. tuberculosis* modificadas genéticamente en las que el gen *PhoP* se había delecionado, conferían mayor protección que *M. bovis* BCG tras la infección experimental con *M. tuberculosis* (Aguilar *et al.*, 2007). Además, en cobayas y ratones infectados con *M. tuberculosis*, el uso experimental de *M. tuberculosis* SO2 mostró una mayor protección (en comparación con la vacuna *M. bovis* BCG) y una menor severidad de la enfermedad en el pulmón (Martín *et al.*, 2006). En estudios realizados en cobayas se evaluó la seguridad de la vacuna *M. tuberculosis* SO2, con el fin de garantizar su potencial inocuidad al ser empleada en el ser humano u otras especies animales (Cardona *et al.*, 2009).

1.3. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN RUMIANTES Y CAMÉLIDOS DE SUDAMÉRICA

El diagnóstico actual de la tuberculosis se basa fundamentalmente en la detección indirecta, mediante el empleo de pruebas que determinan la respuesta inmune desencadenada tras la infección y la detección directa del agente etiológico. Independientemente del principio en el que se fundamente la prueba diagnóstica empleada, todas ellas pueden ser evaluadas en función de una serie de criterios que se revisan a continuación.

1.3.1. Métodos para la evaluación de pruebas diagnósticas

El rendimiento de cualquier prueba diagnóstica se puede evaluar en función de dos parámetros: la **sensibilidad**, la capacidad de una prueba para diagnosticar como positivos a los animales infectados, y la **especificidad**, la capacidad de una prueba para clasificar correctamente como negativos a los animales no infectados (Banoo *et al.*, 2006). La situación idónea se produce cuando una técnica diagnóstica presenta valores máximos tanto de sensibilidad como de especificidad, si bien esta situación es con frecuencia inalcanzable y normalmente el aumento de uno implica un descenso del otro y viceversa (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). Cuando la sensibilidad y la especificidad se ven comprometidos aparecen los fallos diagnósticos, debidos a reacciones negativas en animales infectados

(limitación en la sensibilidad de la prueba diagnóstica), y/o animales sanos que respondan positivamente (limitación en la especificidad de la prueba).

Hasta la fecha el cultivo microbiológico se considera la técnica de referencia (*gold standard*) para el diagnóstico de la tuberculosis (OIE, 2009), de modo que normalmente un resultado positivo se considera prueba de la existencia de la infección, y la sensibilidad de otras técnicas diagnósticas se evalúa en función del resultado del cultivo. Así, un animal positivo al *gold standard* se considera verdaderamente infectado. Debido a la naturaleza de prueba post-mortem del cultivo, esto implica que para la evaluación de la sensibilidad sería necesario el sacrificio de todos los animales incluidos del estudio, hecho que debido a diversas causas no siempre es posible (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001). No obstante, y debido a su sensibilidad limitada, la infección no puede descartarse si el resultado del cultivo es negativo. Por este motivo, la evaluación de la especificidad requeriría en este marco de trabajo el análisis de animales procedentes de poblaciones en las que se conozca a priori el estatus de libres de enfermedad (OTF), de modo que ni siquiera fuera necesario la realización del cultivo microbiológico. Para solventar esta limitación existen alternativas analíticas que permiten la evaluación de las pruebas diagnósticas para la detección de tuberculosis en ausencia de una técnica de referencia (Álvarez *et al.*, 2012b).

De manera adicional, existen otros parámetros para evaluar la eficacia de una prueba diagnóstica: el valor predictivo negativo (VPN), que indica la probabilidad de que un animal negativo en la prueba esté realmente libre de la infección, y el valor predictivo positivo (VPP), que indica la probabilidad de que un animal positivo esté realmente infectado. Ambos valores se ven alterados por la sensibilidad y especificidad de la prueba y además, por la prevalencia de la enfermedad en la explotación (Martin *et al.*, 1987, Medley & Green, 2013, Snider, 1982).

Los modelos de infección experimental permiten evaluar el rendimiento de las pruebas diagnósticas con más precisión, ya que se conoce el momento exacto de la infección y la dosis infectiva empleada. Sin embargo presentan ciertos inconvenientes, ya que normalmente cuando se realizan infecciones experimentales se suelen emplear dosis más elevadas que las que posiblemente tienen lugar en el curso de una infección natural, lo que puede conducir a una sobreestimación de la sensibilidad de las pruebas diagnósticas evaluadas debido a la inducción de una respuesta inmune artificialmente elevada (Szmaragd *et al.*, 2012). También se corre el riesgo de producir una sobreinfección en los animales, alterando el curso normal de la enfermedad e incluso acabando prematuramente con la vida de los mismos.

Existen por tanto varios parámetros a tener en cuenta cuando se pretende evaluar el rendimiento de cualquier prueba diagnóstica. Desde un punto de vista epidemiológico, en situaciones en las que exista tuberculosis siempre se recomienda priorizar la sensibilidad para maximizar la detección de animales infectados, mientras que cuando se confirma la ausencia de la enfermedad puede resultar más conveniente priorizar la especificidad para minimizar el sacrificio innecesario de animales sanos.

1.3.2. Pruebas diagnósticas basadas en la detección de la respuesta inmune

Estas pruebas pueden dividirse a su vez en función de la respuesta inmune hacia la que estén dirigidas, en aquellas destinadas a la detección de la respuesta inmune de base celular o las dirigidas a la respuesta de base humoral.

1.3.2.1. Pruebas diagnósticas para la detección de la respuesta inmune de base celular

Las pruebas incluidas en este grupo son aquellas que detectan la IMC, que es la principal respuesta inmune implicada tras la infección para contener al patógeno (Flynn & Chan, 2001, Pollock & Neill, 2002). A nivel europeo, las pruebas incluidas en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina (Directiva Europea 64/432/CEE) detectan esta respuesta inmune, ya que garantizan la mayor sensibilidad a la hora de detectar animales infectados para poder eliminarlos de la explotación antes de que la IMC disminuya y se desarrolle la respuesta de base humoral (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994).

1.3.2.1.1. Intradermotuberculinización (IDTB)

La IDTB se basa en la producción local de una reacción de hipersensibilidad retardada o de tipo IV (*delayed type hypersensitivity*, DTH) en los animales infectados frente a un antígeno específico (Kindt *et al.*, 2007). Es una reacción inflamatoria de base celular inducida por las citoquinas secretadas por ciertas subpoblaciones de linfocitos Th1 previamente activados por el contacto anterior con un antígeno. Se caracteriza por el reclutamiento al foco infeccioso de multitud de células inflamatorias que tratan de contener la infección, produciendo una reacción inflamatoria local. Predominan los macrófagos, pero también se han descrito células de Langerhans, linfocitos T y basófilos (Doherty *et al.*, 1996a, Palmer *et al.*, 2007b).

En la DTH se distinguen dos fases, en primer lugar tiene lugar una fase de sensibilización en la que se produce el contacto inicial con el antígeno y que cursa sin signos clínicos. La fase de sensibilización dura entre una y dos semanas durante las cuales se produce el reconocimiento antigénico por parte de las APCs y la activación y diferenciación de los linfocitos T. La segunda fase es la fase efectora, producida cuando tiene lugar un segundo contacto con el antígeno y el sistema inmune reacciona para tratar de eliminar al agente patógeno. Veinticuatro horas tras este segundo contacto se manifiestan los primeros signos clínicos, pero la reacción alcanza su máximo apogeo a las 48-72 horas. Si el animal que recibe esta segunda estimulación antigénica había sido expuesto con anterioridad (es decir, estaba infectado) se produce una reacción inflamatoria local. En función de la rapidez en la respuesta y el número de células extravasadas se puede observar edema, exudado,

necrosis (escara), dolor, enfisema subcutáneo, y hasta la infartación del linfonodo regional (Gell & Coombs, 1963). El antígeno que se emplea para la realización de la IDTB es un derivado proteico purificado (*Protein Purified Derivative*: PPD) obtenido a partir del cultivo de *M. bovis* (PPD bovina). Aunque en la actualidad existen distintos fabricantes de PPDs, en España se emplean de rutina las producidas por CZ Veterinaria (España).

La PPD es un extracto de proteínas obtenido de filtrados de cultivos de *M. bovis* en medios sintéticos al que se le añade fenol como agente antimicrobiano en una proporción inferior a 0,5%. Se estima que su composición aproximada es 93% proteína, 6% polisacáridos y 1% ácidos nucleicos (Seibert & Glen, 1941). Su pH puede oscilar entre 6,5 y 7,5, y debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8°C y protegido de la luz. La naturaleza del producto y los propios procesos de producción hacen imposible implementar un proceso de control completo sobre su composición final (Tameni *et al.*, 1998). Desde que se realizó la IDTB por primera vez, se han empleado para la realización de la misma, diversos preparados antigénicos que han evolucionado a lo largo de la historia de la tuberculosis, siendo conocidos de manera genérica como “tuberculinas”.

La primera tuberculina o “linfa de Koch” fue presentada por el médico alemán Robert Koch (1843-1910) en el X Congreso Internacional de Medicina (Berlín, 1890) como tratamiento frente la tuberculosis. Poco tiempo después los ensayos experimentales demostraron que carecía de poder curativo, pero se descubrieron sus excelentes propiedades como elemento de diagnóstico precoz, ya que los médicos observaron cómo tras la inyección de la tuberculina se registraba un incremento de la temperatura de los pacientes, permitiendo discriminar entre aquellos infectados y no infectados. Las primeras experiencias que investigaron la utilidad de la tuberculina con fines diagnósticos en el campo de la medicina veterinaria se realizaron en el instituto veterinario de Dorpat (Rusia) por el veterinario Gutmann (1851-1933). Desde el inicio de la IDTB, la tuberculina empleada en la realización de la misma ha ido evolucionado con el paso de los años, con el fin de obtener un producto final más homogéneo y estandarizado. De entre los compuestos más importantes empleados en la realización de la IDTB destacan los siguientes:

Tuberculina de Koch, (OT: *Old Tuberculin*): la tuberculina de Koch consistía en un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* en caldo glicerinado durante 6-8 semanas, esterilizado posteriormente por calor y concentrado por evaporización. Esta tuberculina fue muy eficaz para el diagnóstico precoz de la tuberculosis. Sin embargo, sus principales inconvenientes eran que al concentrar el reactivo con calor se perdían parte de los componentes proteicos por la desnaturalización y esta pérdida afectaba a su actividad biológica, y que el filtrado final tenía una concentración de glicerina entre 40-50%, hecho que daba lugar en ocasiones a reacciones poco específicas en la IDTB (Sutherland *et al.*, 1964).

Tuberculina sintética: también denominada *heat concentrated synthetic medium* (HCSM) *tuberculin* debido a que se elaboraba partiendo de medios de cultivos de *M. tuberculosis* de 10 semanas realizados en medios sintéticos (Dorset-Henley), sin proteínas animales. La concentración del producto final se obtenía mediante precipitación con ácidos, evitando así cualquier proceso térmico que afectara a los componentes proteicos. En un estudio realizado en ganado bovino en el que se comparó la tuberculina HCSM con la PPD bovina, se demostró que la IDTB fue más específica cuando se realizó con la PPD bovina que con la tuberculina HCSM (Lepper *et al.*, 1977a).

PPD (Protein Purified Derivative): en 1932 la bioquímica Florence Seibert (1897-1991) obtuvo un derivado proteico purificado a partir de *M. tuberculosis* crecido en medios de cultivo sintéticos y precipitado con ácido tricloroacético. Posteriormente en 1934 consiguió un producto más purificado a partir de cepas de *M. bovis* cultivadas en el medio de Dorset que denominó PPD. La principal ventaja de este producto era que podía caracterizarse con rigor y que su contenido proteico podía estandarizarse (Seibert & Glenn, 1941). En la actualidad la PPD bovina, que se obtiene a partir de *M. bovis*, y la PPD aviar, obtenida a partir de *M. avium*, son las PPDs que se utilizan regularmente.

La producción de la PPD consta de varias fases y se debe garantizar la elaboración de un producto conforme a lo que regulan los estándares internacionales (OIE, Farmacopea Europea, OMS). La cepa de referencia para la PPD bovina es la AN5 de *M. bovis*, mientras que para la PPD aviar es la cepa D4ER de *M. avium* subsp. *avium*. Las cepas originales deben identificarse mediante métodos fenotípicos y genotípicos y es necesario mantener un registro de sus orígenes y de su historia posterior para garantizar que sea siempre la misma cepa y que no se haya producido pérdida de material genético en el proceso de obtención, que pueda derivar en la aparición de cepas distintas (Semret *et al.*, 2006). Con el fin de evitar cualquier alteración del producto final el inóculo que servirá para producir la PPD no debe tener más de cinco pases desde el cultivo original. Antes de ser distribuido, el producto final se somete a un ensayo en el que se valora la potencia biológica, la seguridad y la especificidad comparándolos con una PPD de referencia. La medida de la actividad de las tuberculinas se establece mediante el valor de la potencia biológica, medida normalmente en Unidades Internacionales (*International Units*: IU). Según las recomendaciones de la OMS, una IU se define como la actividad contenida en 0,000028 mg del Estándar Internacional (*International Standard*, IS). En 1986, la OMS estableció oficialmente que la PPD de referencia era el IS, cuya potencia biológica se definió en 32.500 IU/ml, y que se encuentra disponible en el *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC, Reino Unido).

La metodología empleada para la valoración de la potencia biológica se detalla en la OIE (OIE, 2009) en la Farmacopea Europea (01/2008:0536) y en la Directiva Europea 64/432/CEE. Generalmente se acepta que la potencia biológica de una PPD, definida como

la capacidad para generar una DTH en sujetos sensibilizados, es similar entre preparaciones producidas por distintos fabricantes, aunque hay evidencias que ponen de manifiesto las diferencias existentes en función de la PPD utilizada tanto en la IDTB (Bakker *et al.*, 2005, Cagiola *et al.*, 2004, Good *et al.*, 2011b), como en el test de detección de IFN- γ (Cagiola *et al.*, 2004, Schiller *et al.*, 2010c).

El contenido proteico presente en la PPD no siempre es constante y no se correlaciona con la actividad biológica de la misma, lo que implica que es necesaria una estrategia alternativa a su determinación para evaluar la potencia biológica de las tuberculinas *in vivo*. Para ello y basándose en un estudio realizado en el ser humano y en cobayas (Hansen *et al.*, 1964), la OMS dictaminó que los ensayos biológicos debían realizarse en cobayas infectadas de forma experimental, y en las mismas especies de destino y mismas condiciones en las que las tuberculinas sean usadas (ganado bovino infectado de manera natural). Como no siempre es posible disponer de ganado bovino infectado de manera natural, se han realizado estudios en cobayas y en bovino sensibilizados de forma experimental, obteniendo una gran variedad de resultados (Dobbelaer *et al.*, 1983, Haagsma, 1986). Sin embargo, años más tarde la antigua Comunidad Económica Europea y la Farmacopea Europea concluyeron que los resultados más fiables de potencia biológica de las PPDs eran los obtenidos con cobayas infectadas de forma experimental, comparado con ganado bovino infectado de forma natural, basándose en un estudio desarrollado en 1995 (Haagsma & Eger, 1995). Finalmente en 2002 se retiró de la Directiva Europea 64/432/CEE la obligatoriedad de testar la potencia de las PPDs en ganado bovino infectado de forma natural, ya que exigía unos requerimientos logísticos y económicos muy elevados.

En las pruebas de potencia *in vivo* además de comparar la respuesta DTH producida por tuberculinas de distintos fabricantes entre si y respecto al IS, es necesario que todas las tuberculinas obtengan una potencia biológica entre el 66% y el 150% de la que viene declarada en su etiqueta (según el fabricante), garantizando así que son aptas para su empleo en los saneamientos en campo. Además, el objetivo último de los ensayos biológicos es que cada país produzca su propio estándar nacional, evitando que el IS se pueda agotar. Cuando se estableció que el IS era la tuberculina de referencia se elaboró un único lote para evitar diferencias posteriores debidas a variabilidad entre distintos lotes. Por tanto, debido a que la disponibilidad del IS es limitada, para evitar usar de forma continua este reactivo biológico se recomienda la elaboración de estándares nacionales en cada país.

Las PPDs que se emplean en las campañas de erradicación de la tuberculosis bovina están contrastadas y deben cumplir las especificaciones que figuran en la Directiva Europea 64/432/CEE. La dosis mínima de antígeno empleado actualmente se decidió tras haber realizado varios ensayos con PPDs de distintas potencias (O'Reilly, 1986), de modo que en la actualidad es necesario que las tuberculinas aseguren al menos una potencia de 20.000 IU/ml [2.000 IU ($\pm 25\%$) por inoculación], y en condiciones en las que se considere que la reactividad

de los animales puede estar comprometida, se recomienda emplear dosis de hasta 5.000 IU por inoculación (OIE, 2009). El empleo en campo de una tuberculina con menor potencia biológica puede tener repercusiones negativas en el control de la tuberculosis bovina, ya que la respuesta celular originada en el hospedador podría ser menor, lo que aumentaría el riesgo de aparición de falsos negativos en las pruebas diagnósticas (Good *et al.*, 2011b). Sin embargo, el uso de una tuberculina con una potencia biológica demasiado elevada tiende a incrementar el número de reacciones falsas positivas producidas por infecciones por miembros del MAC y del grupo MOTT (Ritchie, 1959). Es por tanto de vital importancia desde el punto de vista del diagnóstico de la tuberculosis el empleo en campo de una tuberculina que garantice tanto la máxima sensibilidad como la máxima especificidad.

En la actualidad existe una necesidad urgente de estandarizar la preparación de las tuberculinas, ya que tanto el sistema de producción como la composición del producto final varía entre proveedores (Yang *et al.*, 2012). Se asume que aunque diferentes lotes de PPDs puedan inducir similares respuestas DTH en los animales, las reacciones locales inducidas podrían presentar características diferentes a nivel histológico, lo que sugiere una correlación entre la histopatología y la presencia de ciertos tipos de proteínas en las diferentes PPD, derivadas del proceso de obtención (Cho *et al.*, 2012). Asimismo, los avances en el campo de la proteómica en los últimos años han permitido identificar muchos de los componentes de las PPDs que se emplean actualmente en el diagnóstico de la tuberculosis (Yang *et al.*, 2012). La purificación de reactivos más específicos, principales responsables de producir en los animales infectados la IMC cuantificable por las pruebas diagnósticas, permitiría incrementar el rendimiento de las mismas.

Por otra parte, y de acuerdo con la recomendación de la Unión Europea (Directiva Europea 2010/63/EU) sobre la protección de animales para fines científicos, se están realizando estudios para tratar de desarrollar una técnica *in vitro* alternativa a los ensayos *in vivo* con animales infectados o sensibilizados con *M. bovis* para la determinación de la potencia biológica de las PPDs. Una alternativa es realizar la titulación de las tuberculinas *in vitro*. Si se lograra reproducir en la alícuota de sangre la misma respuesta que se obtiene en piel en la IDTB sería posible validar la potencia biológica de las PPDs sin necesidad de experimentar con animales *in vivo* (Ho *et al.*, 2006, Schiller *et al.*, 2010c, Spohr *et al.*, 2015).

En los últimos años, con el fin de incrementar la especificidad y la sensibilidad de las pruebas diagnósticas para la detección de tuberculosis, se han realizado varios estudios empleando otros antígenos alternativos a la PPD bovina para su empleo en la realización de la IDTB, en el test de detección de IFN- γ y en las pruebas basadas en la respuesta inmune de base humoral. Estos antígenos están presentes en el MTBC y ausentes en el MAC y en algunas de las especies incluidas en el grupo MOTT (Murray *et al.*, 2003). Para evaluar el rendimiento de los mismos se han realizado diversos estudios en animales empleando un único antígeno o una formulación que incluya varios de ellos, y en la mayoría se concluyen

que se obtiene un mejor rendimiento tanto en la sensibilidad como en la especificidad al emplear una combinación de antígenos (Bezoz *et al.*, 2014b, Lyashchenko *et al.*, 1998).

En el hombre el empleo de antígenos alternativos a las PPDs ha demostrado su potencial diagnóstico, obteniendo una mayor sensibilidad y especificidad en la IDTB realizada con una formulación compuesta por ESAT-6 y CFP-10 que al emplear las PPDs (van Pinxteren *et al.*, 2000). También se ha realizado la IDTB en cobayas y en vacas infectadas experimentalmente empleando el ESAT-6 combinado con un lipopeptido bacteriano, con el fin de incrementar la respuesta celular desarrollada por parte del hospedador, obteniendo un incremento en la sensibilidad (Whelan *et al.*, 2003). En un estudio reciente en cobayas sensibilizadas de forma experimental, se puso de manifiesto que la IDTB realizada con el antígeno específico ESAT-6 clasificó como positivos animales sensibilizados con *M. tuberculosis*, no detectando animales sensibilizados con *M. bovis* ni con otras micobacterias no tuberculosas (Moradi *et al.*, 2015). Además, en cobayas sensibilizadas con *M. bovis* BCG se obtuvo una mayor respuesta (diámetro de la reacción en mm) en la IDTB al emplear combinaciones de varios antígenos en lugar de uno solo (Lyashchenko *et al.*, 1998).

Algunos estudios dirigidos a la evaluación de estos antígenos específicos en la IDTB han explorado diversas modificaciones en el protocolo de realización de la prueba, incluyendo lecturas a distintos tiempos y el uso de dosis más elevadas que las que se usan tradicionalmente en el caso de la PPD (Pollock *et al.*, 2003). En ganado caprino y camélidos de Sudamérica, hasta la fecha se han realizado escasos ensayos empleando estos antígenos específicos, siendo necesario realizar más estudios para evaluar su rendimiento y valorar su empleo potencial en determinadas situaciones epidemiológicas.

Realización de la IDTB

El empleo sistemático de la IDTB en ganado bovino se produjo a finales del siglo XIX, en 1891, si bien su uso generalizado en otras regiones fue más tardío (Francis, 1947). Antiguamente se contempló de manera esporádica la inoculación de la PPD bovina de manera sistémica o subcutánea (Anon, 1965, Pritchard, 1988, Snider, 1982), hasta que se comprobó que la inoculación subcutánea dificultaba la interpretación de la prueba y podía interferir en el resultado de la misma (Lepper *et al.*, 1977b, Monaghan *et al.*, 1994). Asimismo se emplearon varias modalidades de la IDTB, incluyendo la prueba oftálmica y palpebral, y el test intradérmico realizado en la vulva que actualmente están en desuso. De entre las variantes de la IDTB más empleadas destacan:

Prueba térmica corta (*short thermal test*): basada en la inyección subcutánea de un volumen de 4 ml del antígeno bovino en el cuello de los animales cuya temperatura rectal no fuera superior a los 39°C. Si la temperatura aumentaba por encima de 40°C cuatro, seis u ocho horas tras la inoculación se consideraba que la reacción era positiva. Esta modalidad se

empleó en Europa durante el siglo XX pero hoy en día está en completo desuso (Monaghan *et al.*, 1994).

Prueba intradérmica doble (*double intradermal test*): esta prueba, variante de la anterior, incluía una nueva inoculación antigénica 48 horas tras haber realizado la primera. Se empleó en Reino Unido durante 1940-1943 (Anon, 1965, Kerr *et al.*, 1946b) hasta que dejó de usarse en 1947 ya que era muy laborioso y varios estudios experimentales demostraron que no incrementaba de forma significativa la proporción de animales infectados detectados (Anon, 1965, Francis, 1958).

Test de Stormont (*the Stormont test*): para la realización de este test se administraba una segunda inoculación del antígeno bovino en el mismo sitio siete días después de la primera. Se consideraba una reacción como positiva si el incremento de grosor del pliegue de piel aumentaba en 5 milímetros (mm) o más a las 24 horas de la segunda inoculación (Kerr *et al.*, 1946b). El empleo de esta prueba permitía la detección de más reactores que la IDTB (simple o comparada) al realizarse en poblaciones de ganado bovino de las cuales no se tenía información de la situación de la enfermedad. Hoy en día también está en desuso debido a que en explotaciones de ganado bovino que se muestrean de manera regular dentro del marco de los programas de erradicación, el rendimiento de esta prueba es menor que el de la IDTB (simple o comparada). Además es un proceso más tedioso y que requiere de más tiempo y dinero para su realización (Kerr *et al.*, 1949).

Durante el siglo XIX se emplearon varias modalidades de la IDTB combinadas con la observación de los animales para determinar la presencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad (caquexia, estrés respiratorio, incremento de temperatura, etc.), y así poder eliminar a los animales enfermos de la explotación (Veranus, 1913). Actualmente está en desuso ya que la clínica de la enfermedad no es patognomónica, por lo que puede confundirse con multitud de procesos patológicos, y aparece en una fase tardía de la misma. Las más empleadas fueron:

Método de Bang: ideado por el veterinario danés Bernhard Lauritz Frederik Bang (1848-1932), consistía en sacrificar a los animales con tuberculosis clínica. Aquellos que reaccionaban positivamente a la IDTB y no mostraban signos compatibles con la enfermedad se aislaban y debían sacrificarse en cuanto apareciesen signos clínicos. Las crías de vacas tuberculosas se separaban de sus madres y se alimentaban con leche de vacas nodrizas, leche procedente de vacas negativas a la prueba e incluso con leche de sus madres previamente sometida a un tratamiento térmico.

Método de Bang modificado: su fundamento teórico es igual al original, sólo que en este caso se sacrificaban todos los reactores positivos a la IDTB. Este método fue el primero que contempló la indemnización a los ganaderos por los animales sacrificados.

Método de Ostertag: diseñado por el veterinario Robert von Ostertag (1864-1940). Prescindía de la IDTB y consistía en eliminar a los animales con tuberculosis abiertas diagnosticadas mediante procedimientos clínicos.

La IDTB se ha empleado en el hombre y los animales para la detección de la tuberculosis desde hace más de 100 años (Monaghan *et al.*, 1994), y es considerada una buena herramienta diagnóstica a nivel de explotación, pero presenta ciertas limitaciones principalmente a nivel individual (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). No se recomienda su uso en animales menores de seis semanas ya que puede dar lugar a resultados poco específicos debido al insuficiente desarrollo de su sistema inmune (Mackay *et al.*, 1989). Además es necesario respetar un periodo mínimo de 42 días entre dos IDTB consecutivas para evitar fenómenos de sensibilización y/o desensibilización (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Kerr *et al.*, 1946a, Lepper *et al.*, 1977a, Monaghan *et al.*, 1994, Palmer *et al.*, 2006), ya que se han descrito fallos diagnósticos relacionados con la frecuencia de repetición de la IDTB. En animales reactores se ha observado cómo tras sucesivas inoculaciones de la PPD se produce una disminución de la respuesta inmune, lo que puede ser debido a un agotamiento inmunológico que se traduce en un menor incremento en el grosor de la piel tras la inoculación de las PPDs (Buxton & Glover, 1939, Coad *et al.*, 2010, Doherty *et al.*, 1995a, Haagsma, 1986, Thom *et al.*, 2004). Tras un periodo de tiempo de 6-8 semanas sin realizar ninguna inoculación de la tuberculina, se recupera la reactividad a la prueba en animales reactores (Paterson, 1959, Radunz & Lepper, 1985, Swindle *et al.*, 1950). Es importante tener en cuenta este efecto en animales dudosos a la IDTB, los cuales pueden someterse a una nueva prueba en un plazo de 42 días tras la última. También se ha observado el caso contrario, animales que reaccionan positivamente a la prueba no porque estén infectados, sino porque están sensibilizados ya que no ha transcurrido el plazo mínimo (de 42 días) entre una prueba y otra (Kerr *et al.*, 1946a, Palmer *et al.*, 2006).

El protocolo de realización de la IDTB cervical consiste en rasurar una zona de piel de unos cinco cm² localizada en la zona cervical anterior, de modo que la región no sea demasiado extensa para localizar correctamente el punto de inoculación y facilitar la medición y la lectura. Si tras rasurar la zona se observaran lesiones, cicatrices o marcas de vacunación, es recomendable realizar una nueva rasuración en una zona adyacente que presente la dermis íntegra y limpia. Antes de inocular la PPD el veterinario realiza la medición en mm de un pliegue de piel en la región rasurada empleando un cutímetro, medida indispensable para realizar la lectura de la prueba. En la IDTB simple se inyecta intradérmicamente 0,1 ml de la

PPD bovina (1mg/ml). Una vez inoculada la PPD es importante que el veterinario asegure mediante palpación que la dosis ha penetrado correctamente en la dermis, en cuyo caso se forma un habón característico, ya que si el volumen no haya penetrado correctamente es posible realizar una nueva inoculación en el mismo punto donde se aplicó la primera. En la Figura 5 se resume el proceso de realización de la IDTB en la localización cervical.



Figura 5. Realización de la IDTB cervical. Medición del espesor del pliegue cutáneo (imagen izquierda), inoculación intradérmica de la PPD bovina (imagen derecha).

En el caso de realizar la IDTB comparada se inocula también una dosis de PPD aviar (0,1 ml, 0,5 mg/ml) en el mismo lado o en el contrario en el que se aplicó la PPD bovina, separando en todo caso la zona de inoculación de las dos PPDs un mínimo de 15 cm para evitar posibles interferencias en la interpretación de la prueba. La lectura de la IDTB se realiza a las 72 horas (± 4) tras la inoculación del antígeno(s). Con el fin de minimizar las posibles diferencias individuales derivadas de la subjetividad de la prueba, dicha lectura debe ser realizada por el veterinario que inoculó el antígeno el primer día, empleando en la medición el mismo cutímetro.

La IDTB también puede realizarse en la base del pliegue caudal (*caudal fold test*), en cuyo caso no es necesario rasurar la zona de la inoculación, pero esta debe estar integra, limpia y sin lesiones ni cicatrices que puedan interferir en la lectura de la prueba. El veterinario selecciona en este caso un pliegue de piel de la unión cutánea localizado en la base de la cola y realiza la medición del mismo con un cutímetro, inoculando posteriormente el antígeno intradérmicamente, y comprobando que el volumen inoculado sea el correcto. Si la es IDTB comparada, se inocula un antígeno a cada lado de la base del pliegue de la cola, aunque por norma general la IDTB comparada se realiza únicamente en la localización cervical. Al igual que en el caso de la prueba cervical la lectura de la IDTB en el pliegue caudal debe ser realizada por el mismo veterinario 72 horas (± 4) tras la inoculación del antígeno(s) y empleando el mismo cutímetro. En la Figura 6 se resume el proceso de realización de la IDTB en la base del pliegue caudal.

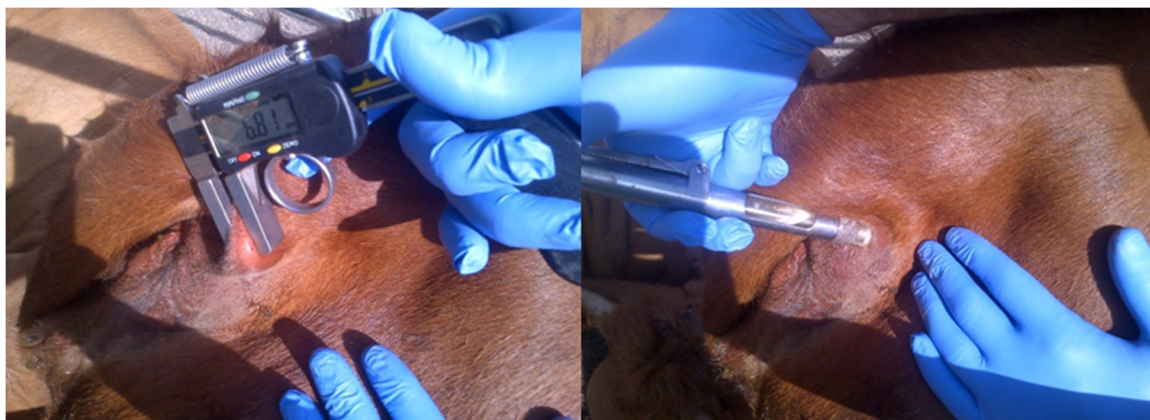


Figura 6. Realización de la IDTB en la base del pliegue caudal. Medición del espesor del pliegue cutáneo (imagen izquierda), inoculación intradérmica de la PPD bovina (imagen derecha).

En España se emplean dos sistemas de inoculación intradérmica de las PPDs para la realización de la IDTB: McIntock (*Bar Knight McIntock Limited*, Reino Unido) y Dermojet (*Akra Dermojet*, Francia). El primero es una jeringa con aguja que lleva incorporado un tapón para desinfectar la aguja entre cada animal, mientras que el segundo es un sistema de inyección sin aguja que funciona con aire comprimido (Figura 7). Diversos estudios han comparado la respuesta al emplear distintas dosis de PPD en la IDTB en ganado bovino, para evaluar el efecto de una inoculación de volumen mayor y/o menor que la recomendada, obteniendo respuestas variables en la prueba de la IDTB (Lepper & Corner, 1976, Lepper *et al.*, 1977b, Monaghan *et al.*, 1994). Según los resultados obtenidos, si la dosis inoculada es superior o inferior a la indicada, la respuesta a la IDTB podría verse afectada, siendo por tanto un factor esencial a tener en cuenta en su realización.



Figura 7. Sistemas de inoculación intradérmica de las PPDs empleados en España para la realización de la prueba de la IDTB. Dermojet (imagen izquierda) y McIntock (imagen derecha).

La interpretación de la IDTB (tanto simple como comparada) se establece en función de las lecturas en mm antes y 72 horas tras la inoculación intradérmica de las PPDs y de la presencia o ausencia de signos clínicos en la zona de inoculación (Monaghan *et al.*, 1994). La interpretación de la IDTB puede ser estándar o severa, siendo normalmente la situación

epidemiológica del rebaño en el que se realice la misma la que determine la elección de una u otra interpretación (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). En España en aquellas situaciones en las que una explotación se considera positiva [de acuerdo con el Real Decreto 2611/1996 y sus modificaciones posteriores, si al menos un animal susceptible de ser examinado por su edad no ha superado las pruebas oficiales (tanto de rutina como complementarias) con resultado favorable, ó no ha sido sometido a la totalidad de las pruebas de diagnóstico previstas en el Real Decreto 1716/2000], se emplea la interpretación severa con el fin de maximizar la detección de animales infectados. Mientras que en situaciones en las que no haya infección, se usa la interpretación estándar para minimizar las reacciones falsas positivas.

De acuerdo con la normativa nacional (Real Decreto 2611/1996) y europea (Directiva Europea 64/432/CEE), cuando se realiza la IDTB simple y se emplea la **interpretación estándar**, se considera una reacción como negativa cuando el aumento del grosor de la piel es igual o inferior a 2 mm en ausencia de signos clínicos, una reacción dudosa cuando el aumento del grosor de la piel es superior a 2 mm e inferior a 4 mm en ausencia de signos clínicos y una reacción positiva cuando el aumento del grosor de la piel es igual o superior a 4 mm y/o se detectan signos clínicos. La **interpretación severa** contempla que cualquier animal dudoso será considerado como positivo si existe en el rebaño además al menos un reactor positivo. Una reacción negativa es aquella en la que el aumento del grosor de la piel es inferior o igual a 2 mm en ausencia de signos clínicos, y una reacción positiva cuando el aumento del espesor de la piel es superior a 2 mm y/o hay presencia de signos clínicos. Asimismo, a nivel nacional se contempla también la **interpretación extra-severa** de la IDTB, según la cual todo animal dudoso se considerará positivo desde el principio (MAGRAMA, 2015).

El empleo de un criterio severo en ausencia de infección disminuye la especificidad de la IDTB en bovino (Álvarez *et al.*, 2012b), caprino (Bezós *et al.*, 2012a) y en camélidos de Sudamérica (Bezós *et al.*, 2013). Por otra parte, el uso del criterio estándar en presencia de infección supondría una pérdida de sensibilidad de la prueba y se dejarían animales infectados en la explotación, hecho que también se ha descrito en bovino (Clegg *et al.*, 2011) y caprino (Bezós *et al.*, 2012a).

La sensibilidad y la especificidad de la IDTB también se ve afectada de manera importante en función de si se realiza en su versión simple o comparada. La IDTB comparada se aplica para realizar el diagnóstico diferencial de las infecciones por otras micobacterias del MAC y/o del grupo MOTT, ya que al aplicarla se valora en el mismo animal la respuesta frente a los dos grupos de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas. Sin embargo se ha descrito que en algunos animales infectados por *M. bovis* se pueden observar reacciones similares a la inoculación de las dos PPDs e incluso reacciones superiores en la inoculación de la PPD aviar que en la de la PPD bovina (Lesslie *et al.*, 1975c). Por tanto, en España la realización

de la IDTB comparada se realiza únicamente en aquellos rebaños calificados como OTF en los cuales, en caso de detectarse algún animal reaccionante positivo o dudoso a la IDTB simple, no se observan lesiones compatibles con tuberculosis ni se consigue aislar ningún miembro del MTBC. La situación de co-infección dificulta el escenario diagnóstico ya que provoca la aparición tanto de falsos negativos (Álvarez *et al.*, 2009) como falsos positivos (Barry *et al.*, 2011) en la IDTB y en el test de detección de IFN- γ en ganado bovino (Álvarez *et al.*, 2009, Aranaz *et al.*, 2006) y en ganado caprino (Álvarez *et al.*, 2008).

Según la normativa nacional (Real Decreto 2611/1996) y europea (Directiva Europea 64/432/CEE), la **interpretación estándar** de la IDTB comparada considera una reacción negativa cuando el aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD bovina es inferior o igual al aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD aviar en ausencia de signos clínicos, reacción dudosa cuando el aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD bovina es superior en no más de 4 mm al aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD aviar en ausencia de signos clínicos, y reacción positiva cuando el aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD bovina es superior a 4 mm al aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD aviar, y/o hay presencia de signos clínicos en el punto de inoculación de la PPD bovina. En cualquiera de los casos es necesario que un animal sea positivo a la IDTB simple para que se considere también positivo a la IDTB comparada. La **interpretación severa** de la IDTB comparada no contempla reacciones dudosas, de modo que se considera una reacción negativa cuando el aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD bovina es inferior o igual al aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD aviar, y no hay ningún signo clínico en la inoculación de la PPD bovina, y una reacción positiva cuando el aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD bovina es superior al del aumento de grosor de la piel inoculada con la PPD aviar, y/o hay presencia de signos clínicos en la inoculación de la PPD bovina.

Inicialmente la IDTB propuesta por Moussu y Mantoux en 1908, se realizaba en la base del pliegue caudal ya que se consideraba la mejor localización (Buxton & Glover, 1939, Francis, 1947). Finalmente Christiansen y Stubb recomendaron en 1910 el uso de la zona cervical, porque observaron que era en la que se obtenían los resultados más consistentes (*Tuberculosis Eradication Conference*, 1959). Actualmente la IDTB en ganado bovino se realiza en la zona cervical y la base del pliegue caudal, dependiendo la selección de una u otra localización de la legislación vigente de cada país, mientras que en el ganado caprino se emplea de rutina la zona cervical. La zona caudal se considera una región más práctica desde un punto de vista logístico, pero se ha descrito que en general ofrece una sensibilidad ligeramente inferior que la cervical (de Kantor *et al.*, 1984, Farnham *et al.*, 2012, Francis *et al.*, 1978, Norby *et al.*, 2004, Whipple *et al.*, 1995), ya que es una zona que por lo general suele estar más sucia que la región cervical y a veces es complicado realizar la interpretación de la prueba.

En un estudio realizado para comparar las dos localizaciones, animales reactivos obtuvieron valores medios de incremento de grosor de piel menores en la base del pliegue caudal que en la zona cervical (Baisden *et al.*, 1951). Por otra parte, la piel de la zona cervical se considera más sensible para la realización de la IDTB, para suplir esta deficiencia cuando la prueba se realiza en la base de la cola pueden emplearse mayores cantidades de tuberculina (Schiller *et al.*, 2010b). Actualmente la IDTB en la base del pliegue de la cola se realiza en Canadá, Estados Unidos, y Nueva Zelanda, y fue la prueba empleada en Australia en su programa de erradicación de la tuberculosis bovina (Tweddle & Livingstone, 1994). En Europa se emplea la zona cervical de acuerdo con la Directiva Europea 64/432/CEE, siendo la localización idónea la parte anterior del cuello (Figura 8).



Figura 8. Localización idónea para realizar la prueba intradérmica en la región cervical anterior en ganado bovino.

1.3.2.1.1.1. Rendimiento de la IDTB en rumiantes y camélidos de Sudamérica

La IDTB ha mostrado su elevado valor como herramienta diagnóstica a lo largo de la historia y ha permitido erradicar la tuberculosis bovina en varios países (Good & Duignan, 2011). Se ha empleado en el hombre y los animales porque es una prueba barata, no precisa de grandes requerimientos logísticos y hasta la fecha no se ha obtenido otra técnica diagnóstica que mejore su rendimiento. Sin embargo, el hecho de que haya una proporción significativa de hallazgos de lesiones en matadero procedente de animales negativos a la IDTB pone de manifiesto sus limitaciones en determinadas circunstancias (Olea-Popelka *et al.*, 2008). Es necesario además tener en cuenta que su interpretación y por tanto sus resultados pueden variar en función de la situación epidemiológica, del antígeno y del protocolo empleado.

En el **ganado bovino** se han realizado multitud de estudios con el fin de evaluar el rendimiento de la IDTB cervical simple, comparada y realizada en el pliegue caudal. Diversas

revisiones publicadas en los últimos años, incluyendo trabajos realizados en varios países que empleaban normalmente el cultivo como técnica de referencia, han descrito valores de sensibilidad de la IDTB simple, realizada en la zona cervical de entre 65 y 100% (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994). La aplicación de métodos analíticos Bayesianos alternativos que no requieren de una técnica de referencia, arrojó valores de sensibilidad del 53% [intervalo de confianza (IC) 95%, 27,3-81,5] o 69,4% (IC 95%, 40,1-92,2,) en función de la interpretación aplicada (estándar o severa respectivamente). Si bien es cierto que en ese trabajo se incluyó una proporción de rebaños de aptitud lidia, en los cuales la realización de la IDTB es especialmente delicada, hecho que podría explicar la menor sensibilidad obtenida, comparado con los demás estudios consultados (Álvarez *et al.*, 2012b). En otro trabajo desarrollado recientemente sin emplear una técnica de referencia, la sensibilidad fue superior, ya que se obtuvo un valor de 84,2% (IC 95%, 59,0-98,2) (Praud *et al.*, 2015). La especificidad de la IDTB se considera más elevada, con valores más probables entre 96 y 99% pero intervalos amplios en función del estudio contemplado, llegando a variar entre 75 y 99% (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994). El uso de técnicas de estimación sin necesidad del *gold standard*, también ha resultado en valores de especificidad muy elevados, superior al 99%, independientemente de la interpretación aplicada (Álvarez *et al.*, 2012b).

Los antígenos específicos de algunos miembros del MTBC se diseñaron inicialmente para su uso en el test de detección de IFN- γ , aunque en los últimos años varios estudios han puesto de manifiesto su empleo potencial en la IDTB (Bezoz *et al.*, 2014b). Siendo especialmente útiles en situaciones en las que existe co-infección con paratuberculosis para incrementar el rendimiento de la prueba (Aagaard *et al.*, 2010, Flores-Villalva *et al.*, 2012). Para su empleo, se encuentran disponibles en formato individual o combinados en formulaciones antigénicas. Pollock y colaboradores pusieron de manifiesto que en animales infectados de manera experimental, la sensibilidad más elevada de la IDTB realizada con el ESAT-6 se obtuvo 96 horas tras la inoculación del mismo, además de emplear dosis más concentradas que para las PPDs. En este trabajo la IDTB alcanzó una sensibilidad de 82% realizada con el ESAT-6 y de 86% con las PPDs (Pollock *et al.*, 2003). En otro estudio se empleó el formato antigénico ESAT-6 y CFP-10 comparado con la PPD bovina, la sensibilidad del compuesto antigénico fue aceptable en explotaciones de elevada prevalencia, mientras que en las de baja prevalencia el rendimiento obtenido con el compuesto antigenico fue superior que con la PPD (Aagaard *et al.*, 2010). En otro estudio posterior en el que también se empleó las PPDs y la formulación antigénica ESAT-6 y CFP-10, la sensibilidad de la IDTB fue similar en los dos casos, alcanzando el 44,7% con las PPDs, y el 40,9% con la formulación antigénica (Flores-Villalva *et al.*, 2012). Además, en otro estudio, se puso de manifiesto que al añadir a la formulación antigénica ESAT-6 y CFP-10 el antígeno Rv3020c, se incrementaba la sensibilidad de la IDTB (comparado con las PPDs) (Jones *et al.*, 2012). En animales

infectados de forma natural y reactores a la IDTB, también se empleó una formulación antigénica compuesta por ESAT-6, CFP-10, MPB70 y MPB83, obteniendo una sensibilidad de 78,3% (Whelan *et al.*, 2010a). En un trabajo reciente se evaluó la formulación antigénica CFP-10, ESAT-6 y TB10.4 para la realización de la IDTB en el pliegue caudal en dos poblaciones distintas de animales con infección natural, obteniendo valores similares tanto de sensibilidad (87 y 93%) como de especificidad (97 y 92%) (Xin *et al.*, 2013). Cuando se evaluó la especificidad de los antígenos sobre animales libres de tuberculosis pero infectados con el grupo MOTT, la especificidad de la IDTB fue del 100% con el ESAT-6 y de 90% empleando las PPDs (Pollock *et al.*, 2003). Sin embargo, en una proporción de explotaciones libres de la enfermedad, la especificidad de la IDTB realizada con la formulación ESAT-6 y CFP-10 también fue del 100%, y cuando ésta se realizó con las PPDs disminuyó al 60% (Aagaard *et al.*, 2010). Además, en un trabajo en el que se empleó el mismo cóctel, al añadir el antígeno Rv3020c se mantuvo la especificidad de la misma (Jones *et al.*, 2012). En resumen, si bien el uso de antígenos alternativos ha demostrado su potencial para incrementar la especificidad de la IDTB, particularmente en situaciones complejas en las que los animales puedan estar sometidos a una exposición de antígenos inespecíficos, su posible uso de manera rutinaria está más limitado debido a su rendimiento subóptimo en términos de sensibilidad.

Respecto a la sensibilidad de la IDTB realizada en el pliegue caudal en ganado bovino, se han descrito valores que oscilan entre 68 y 96,8% (Monaghan *et al.*, 1994). Siendo similares a los alcanzados en un estudio realizado sobre 20 animales sensibilizados de manera experimental, ya que la sensibilidad de la IDTB realizada en la base de la cola varió entre 80 y 85% (Whipple *et al.*, 2001). En otro estudio realizado sobre animales procedentes de explotaciones con infección natural, la sensibilidad descrita para aquellas con prevalencia moderada de la enfermedad fue 96,8% y en aquellas clasificadas como de baja prevalencia fue 83,3% (Norby *et al.*, 2004). Un meta-análisis de resultados publicados utilizando esta prueba arrojó valores de sensibilidad entre el 80,4 y 93% (Farnham *et al.*, 2012). Actualmente en Estados Unidos, cuando el resultado de la IDTB en el pliegue caudal se considera no concluyente, se realiza la IDTB comparada en la zona cervical para determinar el estatus del animal. En esos casos la sensibilidad de la IDTB realizada en la base de la cola varía entre 74,4 y 88,4% mientras que la especificidad obtenida oscila de media entre el 97,3 y 98,6% (Bezos *et al.*, 2014b). Tradicionalmente, la especificidad de la IDTB realizada en el pliegue caudal se estimó entre 96 y 98,8% (Monaghan *et al.*, 1994, Whipple *et al.*, 2001), si bien en un meta-análisis de resultados se han descrito intervalos más amplios de entre 89,2 y 95,2% (Farnham *et al.*, 2012).

Por último, los valores de sensibilidad descritos para la IDTB comparada en ganado bovino, incluyen un rango muy amplio, entre 52 y 100% (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b), si bien otro trabajo realizado sin *gold standard* estimó valores de sensibilidad (interpretación estándar) en la parte más baja del intervalo, alrededor de 52,9% (Clegg *et al.*, 2011). No

obstante en un trabajo posterior se alcanzaron valores superiores de sensibilidad, alrededor de 81% (IC 95%, 70-89) con la interpretación estándar y 85% (IC 95%, 78-91) con la interpretación severa (Karolemeas *et al.*, 2012). La especificidad de la prueba comparada es en general superior a la de la IDTB simple, con un valor medio del 99,5% y un rango entre 78 y 100% (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). Mientras que en un estudio realizado en Irlanda (país que de rutina emplea la IDTB comparada), sin emplear el *gold standard*, se concluyó que la especificidad fluctuaba entre 99,2 y 99,8% (Clegg *et al.*, 2011), y en Reino Unido (también se usa de rutina la prueba comparada), la especificidad de la misma fue superior al 99% (Goodchild *et al.*, 2015).

En el **ganado caprino**, como ya se ha comentado anteriormente, existe menos información disponible sobre el rendimiento de las pruebas, si bien en un estudio la IDTB simple cervical obtuvo un valor medio de sensibilidad de 38,8% (IC 95%, 35,5-42,3) con la interpretación estándar y 43,9% (IC 95%, 40,4-47,4) con la interpretación severa (Bezós *et al.*, 2014a). Siendo estos valores más limitados que los estimados en ganado bovino. Los animales incluidos en el estudio pertenecían a una comunidad autónoma en la que el ganado caprino está sometido a programa de erradicación, por lo que la elevada presión diagnóstica podría explicar al menos en parte los resultados. Una revisión de los trabajos realizados en el ganado caprino ofreció unos valores de sensibilidad de la prueba simple de entre el 44,6 y el 93,8% (Bezós *et al.*, 2012a). Mientras que, en otro trabajo, con la interpretación estándar, la sensibilidad de la IDTB fue inferior (53,2%), debido quizá a que se incluyó un porcentaje elevado de animales jóvenes, hecho que pudo sesgar los resultados obtenidos (Liébana *et al.*, 1998). Al estimar la especificidad de la IDTB simple bajo distintas condiciones epidemiológicas, los valores oscilaron entre 97,6 y 99,2% (Bezós *et al.*, 2012c), mientras que en un trabajo previo, el valor obtenido había sido de 87,5% (Marín, 1993).

Cuando se analizó la sensibilidad de la IDTB comparada, en un estudio realizado en ganado caprino infectado de forma natural el valor obtenido fue 83,7%, si bien es cierto que no se pudo confirmar el estatus en la totalidad de los animales muestreados (Gutiérrez *et al.*, 1998). En otro trabajo, la sensibilidad media de la IDTB comparada con la interpretación estándar fue 7% (IC 95%, 4,9-9,8) mientras que con la interpretación severa se incrementó al 21,3% (IC 95%, 17,6-25,4) (Bezós *et al.*, 2014a), siendo inferior a la alcanzada en un trabajo anterior, con un valor de 44,5% (Buendía *et al.*, 2013). En un estudio realizado en condiciones de campo, la especificidad de la IDTB comparada fue 100% (Gutiérrez *et al.*, 1998), siendo este valor superior al observado en otro trabajo, en el cual la especificidad de la IDTB comparada evaluada en rebaños libres de tuberculosis bajo distintas condiciones epidemiológicas, fue superior a la de la prueba simple, con valores que oscilaron entre 99,4 y 100% (Bezós *et al.*, 2012c).

En los **camélidos de Sudamérica** se han descrito valores limitados de sensibilidad y especificidad de la IDTB, si bien con una gran incertidumbre asociada a la precisión de estas

estimaciones debido al reducido número de animales analizados, que oscilan entre 2 y 24 por estudio (Álvarez *et al.*, 2012a). Hasta hace pocos años los resultados obtenidos con la IDTB en los camélidos de Sudamérica sugerían que la interpretación de la misma 96 horas tras la inoculación de las PPDs incrementaba su sensibilidad (Dean *et al.*, 2009, García-Bocanegra *et al.*, 2010, Stevens *et al.*, 1998), siendo además la localización axilar en la que se había obtenido un mejor rendimiento (Lyashchenko *et al.*, 2007, Ryan *et al.*, 2008). Sin embargo en un trabajo reciente, el número de reactores detectados en la zona pre-escapular fue ligeramente superior a los clasificados por las localizaciones axilar y cervical, si bien no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad de la IDTB en función de la localización empleada. Asimismo, cuando la interpretación de la IDTB se realizó 72 horas tras la inoculación de las PPDs, la sensibilidad obtenida fue superior que cuando se interpretó 120 horas tras la inoculación de las PPDs (Bezoz *et al.*, 2013). En un trabajo de revisión (Álvarez *et al.*, 2012a), se detalla que la sensibilidad de la IDTB (realizada generalmente en la localización axilar) fue menor en los estudios en los que se emplearon animales con infección natural, oscilando entre 0 y 14,3%, mientras que en estudios en los que se emplearon animales infectados de manera experimental la sensibilidad de la IDTB osciló entre 80 y 100%. No obstante, en casos puntuales se han descrito mayores sensibilidades en casos de infección natural en camélidos del viejo mundo, si bien con un tamaño de muestra muy reducido (n=3) (Wernery *et al.*, 2007). En un trabajo realizado en condiciones de campo en Perú, la especificidad de la IDTB en camélidos de Sudamérica varió entre 95,6 y 100% (Bezoz *et al.*, 2014c), siendo similar a la descrita en trabajos previos (100%) (Cousins & Florisson, 2005, Lyashchenko *et al.*, 2007).

La sensibilidad de la IDTB comparada en estos animales presenta menor rendimiento que la IDTB simple en situaciones de infección (Bezoz *et al.*, 2013), mientras que en ausencia de enfermedad, la especificidad de la prueba comparada fue superior a la de la prueba simple (Bezoz *et al.*, 2014c), al igual que lo observado en otras especies de rumiantes domésticos. La realización de la IDTB en el pliegue caudal se ha practicado en un número limitado de animales, por lo que no es posible realizar una evaluación concluyente de su rendimiento (Álvarez *et al.*, 2012a) y, hasta la fecha no se han descrito estudios empleando antígenos específicos del MTBC en la IDTB en este grupo de animales.

Como se ha descrito anteriormente, la IDTB cervical realizada con la PPD bovina es más sensible que la IDTB comparada en todas las especies evaluadas, siendo su especificidad ligeramente inferior. Por este motivo, en situaciones epidemiológicas que requieran incrementar la especificidad en ausencia de tuberculosis y ante la sospecha de una posible interferencia diagnóstica, es aconsejable el empleo de la IDTB comparada. Sin embargo, en el ganado caprino sometido a programas de control de tuberculosis en España la prueba de rutina seleccionada es la IDTB comparada ya que es una prueba más específica que la prueba simple, particularmente en el caso de que se aplique la vacunación frente a

paratuberculosis (Juste & Perez, 2011) o se produzcan casos de co-infección con *C. pseudotuberculosis* (Brown & Olander, 1987), siendo ambas situaciones frecuentes en esta especie animal.

1.3.2.1.2. Test de detección de interferón-gamma (IFN- γ)

El test de detección de IFN- γ es una prueba que revela la producción *in vitro* de IFN- γ producido principalmente por los linfocitos T sensibilizados tras el contacto con un antígeno específico en sangre (Wood & Rothel, 1994), desarrollado en Australia a finales de los años 80 (Wood & Jones, 2001). Inicialmente se trabajaba con las células mononucleadas de la sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*: PBMC) siendo el proceso de obtención muy largo y costoso, por lo que finalmente se pasó a trabajar con sangre completa (Rothel *et al.*, 1990). Es una prueba complementaria para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el ámbito de la normativa comunitaria Europea. El empleo conjunto de las dos pruebas diagnósticas en paralelo se incluyó en la regulación en 2002 con el fin de detectar el máximo número de animales infectados, acortando el tiempo necesario para eliminar la infección de la explotación (Directiva Europea 64/432/CEE). En determinadas circunstancias, en algunos países se contempla el empleo del test de detección de IFN- γ con muestras recogidas tras la inoculación de las PPDs aplicando una interpretación en serie de los resultados obtenidos (EFSA, 2012). Es por tanto una prueba diagnóstica cuyo uso en Europa se contempla en explotaciones en las que se ha confirmado la tuberculosis previamente, y siempre de manera complementaria a la IDTB.

El test se compone de dos fases: la primera consiste en la extracción de las muestras y su remisión al laboratorio en donde se estimula con los antígenos (PPDs o antígenos específicos) y se incuba durante 18-24 horas, y la segunda consiste en la detección del IFN- γ con un *enzyme-linked immunoSorbent assay* (ELISA) tipo sándwich (Wood *et al.*, 1990).

La primera fase es la más crítica, ya que hay multitud de factores que pueden afectar a la realización de la misma y modificar los resultados obtenidos. Con el fin de evitar respuestas inespecíficas su uso no se recomienda en animales menores de 6 meses (Mackay *et al.*, 1989). Es necesario emplear tubos con heparina de litio al realizar la recogida de la sangre ya que el uso de otro anticoagulante puede interferir en la prueba (Rothel *et al.*, 1990, Rothel *et al.*, 1992). Para que los linfocitos produzcan IFN- γ específico es esencial que se extremen las medidas que garanticen su viabilidad, tanto al realizar la recogida de la sangre como en el transporte de la misma (evitando variaciones extremas de temperatura) ya que cualquier daño y/o alteración en el proceso podría modificar su capacidad de producción de IFN- γ (Okafor *et al.*, 2013).

Uno de los puntos críticos que presenta este test diagnóstico es el tiempo que transcurre desde que se recoge la sangre hasta que se realiza la estimulación de la misma en

el laboratorio (Schiller *et al.*, 2009). Este aspecto es un factor limitante en ciertas regiones, debido al número y a la accesibilidad de laboratorios acreditados para realizar esta técnica, lo que puede hacer necesario considerar tiempos de espera prolongados. La recomendación original contemplaba que este intervalo no excediera las 16 horas (Rothel *et al.*, 1992), si bien actualmente en España las instrucciones del fabricante recomiendan que la estimulación de la sangre se realice en las ocho primeras horas tras su recogida. Varios estudios han demostrado que a medida que se incrementa el tiempo entre la recogida y la estimulación de la sangre los valores de densidad óptica (DO) obtenidos disminuyen, comprometiendo en determinadas ocasiones la sensibilidad del test (clasificación errónea de animales infectados como negativos) tanto en ganado caprino como en bovino.

En uno de los primeros trabajos realizados con el fin de dilucidar este aspecto, se seleccionaron animales libres e infectados de forma natural (más de 100 animales incluidos en cada grupo) y las muestras se estimularon 8 y 28 horas tras su extracción. A pesar de que se produjo una disminución de los valores de DO, no se observaron diferencias significativas ni en la sensibilidad ni en la especificidad obtenidas con las muestras estimuladas a distintos tiempos (Ryan *et al.*, 2000). Posteriormente se evaluó el efecto de este parámetro en 20 animales sensibilizados con *M. bovis* y comparando muestras estimuladas 2 y 24 horas tras su recogida. El valor medio de DO obtenido al estimular las muestras a las 2 horas post-recogida fue significativamente superior que cuando el test se realizó con muestras estimuladas 24 horas tras su recogida, aunque tampoco hubo diferencias en el número de animales clasificados como positivos entre los dos tiempos evaluados (Whipple *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro estudio realizado por Gormley y colaboradores, con 89 animales reactivos y no reactivos a la IDTB procedentes de explotaciones con infección natural, se observó una disminución en la sensibilidad del test de detección de IFN- γ realizado con muestras estimuladas 24 horas tras su recogida en comparación con aquellas estimuladas tras 8 horas, siendo especialmente significativa en el grupo de animales que habían sido negativos a la IDTB (Gormley *et al.*, 2004). En algunos animales no fue posible realizar el examen post-mortem, por lo que estos resultados podrían sugerir también un incremento en la especificidad. Años más tarde, en otro ensayo realizado por Waters y colaboradores, tampoco se observó un cambio en la DO de las muestras procedentes de siete animales infectados de forma experimental al realizar el test de detección de IFN- γ con muestras estimuladas 8 y 24 horas tras su extracción (Waters *et al.*, 2007), si bien los animales incluidos eran menores de 6 meses y quizá este hecho podría explicar los resultados obtenidos. Por último, en un estudio realizado por Schiller y colaboradores, en ganado libre e infectado de forma experimental y natural (aproximadamente 200 animales cada grupo), se puso de manifiesto que la estimulación de las muestras realizada 24 horas en lugar de 8 horas tras su recogida ocasionaba una disminución en la sensibilidad de la prueba (de un 96% a un 90%), y un incremento en la especificidad de la misma de un 85% a un 97% (Schiller *et al.*, 2009).

Para evaluar el efecto del tiempo transcurrido desde que se recogen las muestras hasta que se estimulan en ganado caprino, en otro estudio se seleccionaron 50 muestras de animales procedentes de explotaciones en las que se había confirmado la infección de forma natural por *M. caprae*, estimulando las muestras 8, 16 y 24 horas tras su recogida. Se comprobó que tanto el valor de la DO como la sensibilidad obtenidos fueron superiores con las muestras estimuladas 8 horas después de su extracción (Bezós *et al.*, 2011b). A la luz de los estudios realizados, en situaciones de infección lo más recomendable es realizar la estimulación de las muestras en las 8 primeras horas tras su obtención, pero si por motivos logísticos no es posible, otra medida a tener en cuenta para mantener la sensibilidad de la prueba podría ser modificar el punto de corte del test de detección de IFN- γ para la interpretación de los resultados (Faye *et al.*, 2011).

Otro factor a tener en cuenta en el test de detección de IFN- γ es el momento en el que se realizó la última IDTB. Se ha especulado sobre el efecto que tiene la inoculación de las PPDs en el resultado del test de detección de IFN- γ , ya que existen resultados contradictorios al respecto (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006b, Schiller *et al.*, 2010b). De acuerdo al protocolo vigente en España, el test de detección de IFN- γ debe realizarse en muestras procedentes de animales en los que no se haya aplicado la IDTB en un periodo mínimo de 60 días (MAGRAMA, 2015). Algunos estudios han demostrado que cuando la prueba se realiza con muestras obtenidas tras la IDTB, los valores de DO obtenidos se incrementan, y se compromete, en determinadas ocasiones la especificidad del test. En animales infectados de forma natural no se observaron diferencias significativas en los valores de DO obtenidos tras la estimulación con PPD bovina y PPD aviar en el test de detección de IFN- γ , realizado con las muestras recogidas antes o hasta 65 días después de la IDTB comparada (Gormley *et al.*, 2004). En animales infectados en condiciones naturales, a los que se inoculó la PPD bovina en el pliegue caudal, y posteriormente se sometieron a una IDTB comparada en la zona cervical, tampoco se observó ningún efecto en los valores de DO cuando el test de detección de IFN- γ se realizó antes o después de la inoculación de las PPDs (Coad *et al.*, 2010, Rangen *et al.*, 2009). En un trabajo realizado en animales infectados de manera experimental no se observaron diferencias en los valores de DO obtenidos en el test de detección de IFN- γ cuando se realizó con muestras extraídas antes y después de la IDTB comparada (Whelan *et al.*, 2004). Sin embargo, en otro estudio posterior se observó un incremento en los valores de DO cuando el test de detección de IFN- γ se realizó con muestras recogidas antes y después de la IDTB en el la base del pliegue caudal, seguido de una prueba comparada en la zona cervical (Palmer *et al.*, 2006). Por último, en otro trabajo en el que las PPDs se inocularon en el pliegue caudal, se observó un incremento de los valores de DO en el test de detección de IFN- γ realizado con muestras recogidas tras la inoculación de las PPDs. Además en este mismo estudio, de forma anecdótica, hubo algunos animales en los que el efecto de la IDTB sobre el test de detección de IFN- γ se tradujo en una disminución de los valores de DO (Rothel *et al.*,

1992). Asimismo, Whipple y colaboradores, observaron que al realizar el test de detección de IFN- γ con muestras obtenidas entre 3 y 63 días tras la IDTB realizada en el la base de la cola, se producía un incremento en los valores de DO, mientras que al emplear la IDTB comparada no se observaba ningún incremento. Además, se obtuvieron resultados similares en el test de detección de IFN- γ realizado con muestras obtenidas 3 días tras la IDTB realizada en el pliegue caudal estimuladas 2 y 24 horas después de su recogida (Whipple *et al.*, 2001). Otros factores, como la situación epidemiológica de la explotación, el tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras hasta la estimulación y las PPDs empleadas en la misma, son también variables a tener en cuenta al analizar la posible sensibilización causada por la IDTB en el test de detección de IFN- γ .

Para la realización del test, una vez en el laboratorio la muestra de sangre de cada animal se divide en tres alícuotas que se estimulan con una solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*: PBS) que se emplea como control negativo para estimar el valor basal del IFN- γ , y las PPDs aviar y bovina. Para esta estimulación pueden utilizarse aquellas que vienen incluidas con el ELISA comercial o bien usar las mismas que se emplean en la IDTB (a una concentración más diluida, 20 $\mu\text{g/ml}$) (Rothel *et al.*, 1992). Es necesario que las PPDs empleadas en la estimulación estén en perfecto estado y tengan una potencia biológica adecuada. Para asegurar la viabilidad de la muestra y garantizar la calidad de los resultados obtenidos se puede emplear un mitógeno para estimular la sangre, es una sustancia que induce la división celular de forma inespecífica incrementando la producción de IFN- γ (de Vries *et al.*, 1980). Sin embargo, hasta la fecha su empleo e interpretación no se han estandarizado, ni tampoco se han caracterizado las posibles variaciones obtenidas en función de la especie animal. Tras la estimulación las muestras se incuban a 37°C durante 18-24 horas; aunque en principio se había aconsejado que la incubación se hiciera en presencia de CO₂ (5%), ya que es un compuesto que se emplea para estabilizar el pH de muestras biológicas, se ha comprobado que la presencia o ausencia de CO₂ no interfiere en los resultados del test (Schiller *et al.*, 2009). La temperatura de incubación es otro factor que puede interferir en los resultados de la prueba, ya que se ha comprobado como la incubación de las muestras en temperaturas inferiores a 33°C interfiere en la producción de IFN- γ (Schiller *et al.*, 2009, Waters *et al.*, 2007). Tras la incubación las muestras se centrifugan para separar el plasma, ya que es la fracción que se emplea en el ELISA.

En la segunda fase, se emplea un ELISA comercial para realizar la detección de IFN- γ presente en cada muestra, en la actualidad existen varios kit disponibles. Para la presente tesis doctoral se empleó el kit Bovigam (*Bovigam, Thermo Fisher Scientific, USA*) en empleo en España hasta el año 2015. En un principio se recomendó realizar el análisis de cada muestra por duplicado (incrementando el tiempo y el coste del test), pero como varios estudios no encontraron diferencias en los resultados obtenidos cuando se analizaron las mismas muestras realizadas en duplicado, tanto en ganado bovino (Gormley *et al.*, 2013b, Faye *et al.*,

2011) como en caprino (Bezós *et al.*, 2011b), actualmente a nivel nacional se realiza un único análisis de cada muestra. Tras la realización del ELISA, el resultado final de cada muestra se decide en función del valor de DO obtenido en cada pocillo estimulado con PBS, PPD aviar y PPD bovina respectivamente. Los criterios empleados para definir el punto de corte pueden variar en función de la situación epidemiológica de cada país, de modo que existen diferentes puntos de corte en uso en Europa (EFSA, 2012). En relación a los distintos kits comerciales disponibles, se han observado diferencias en cuanto a los requerimientos logísticos del laboratorio, como por ejemplo en lo referente a la muestra de partida. La mayoría de los kits realizan la estimulación de la sangre entera y posterior recogida del plasma, mientras que en otros es necesario extraer la fracción de PBMC. Por norma general se emplea la dilución 1:2 de la muestra, pero algún kit recomiendan otra dilución (1:10) en función del valor de DO obtenido previamente. Hay kits que precisan incluir de un mismo animal la muestra estimulada con PBS, PPD aviar y PPD bovina, mientras que otros requieren únicamente de la muestra estimulada con las PPDs. También se observaron factores técnicos, ya que en algunos kits la placa viene tapizada con Ac específicos anti-IFN- γ , mientras que en otros es necesario tapizarla antes de realizar el ELISA. Además, se identificaron diferencias en cuanto a la interpretación de los resultados que pudieran afectar a los mismos. Algunos kits emplean únicamente el valor de la DO de las muestras estimuladas, otros calculan un *ratio* empleando este valor y el de los controles negativos y positivos incluidos en el ELISA, mientras que otros elaboran una curva patrón obtenida a partir de una serie de diluciones de IFN- γ bovino recombinante incluido en la placa.

Además de su empleo para maximizar la detección de animales infectados, como se ha comentado anteriormente, algunos países de la Unión Europea han explorado la posible aplicación del test de detección de IFN- γ para minimizar el riesgo de obtener respuestas positivas en animales sanos mediante su aplicación tras la IDTB. Por ejemplo, en Francia se ha valorado el uso de la prueba de IFN- γ en serie para confirmar una respuesta no específica obtenida en la IDTB en regiones con baja prevalencia de tuberculosis, ajustando el punto de corte y empleando antígenos específicos del MTBC (Faye *et al.*, 2011). No obstante, y como se ha comentado anteriormente, su aplicación tras la IDTB plantea el potencial problema de interferencia con la inoculación de la PPD bovina si el test se realiza en los 60 días siguientes tras la IDTB, si bien el grado en el que el resultado de la prueba puede verse afectado no está totalmente definido.

1.3.2.1.2.1. Rendimiento del test de detección de IFN- γ en rumiantes y camélidos de Sudamérica

Una de las principales ventajas que presenta el test de detección de IFN- γ es que su interpretación es menos subjetiva que la de la IDTB, ya que para determinar si un animal es positivo se establece un punto de corte numérico. Asimismo el protocolo está más estandarizada que el de la IDTB, aunque existen numerosos puntos críticos que pueden afectar a la realización del mismo, además del propio punto de corte, que varía dependiendo del país en el que se realice el test. En 2012 la Comisión Europea solicitó a la EFSA un informe científico para evaluar si el test de detección de IFN- γ se podría considerar como una prueba diagnóstica independiente de la IDTB. La EFSA concluyó que había suficientes evidencias de que la sensibilidad del test *in vitro* es similar o superior a la que se estima para la IDTB (prueba oficial para el diagnóstico de tuberculosis bovina), y que la especificidad del test de detección de IFN- γ no es inferior que el test menos específico contemplado en la legislación, aunque en determinadas circunstancias la especificidad del test de detección de IFN- γ es más limitada, pudiendo ser inferior a la descrita para la IDTB (EFSA, 2012).

En el **ganado bovino** el test de detección de IFN- γ realizado en situaciones de campo sobre animales en los que se confirmó la infección en distintos países, determinó una sensibilidad que varió entre 81,8 y 100% (Wood & Jones, 2001), siendo similar a la obtenida en un trabajo científico realizado posteriormente, en el que se estimó un valor medio de sensibilidad de 87,6%, con un rango de valores posibles que oscila entre 73 y 100% en función del estudio contemplado (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). Mientras que al no emplear el *gold standard* para calcular el rendimiento del test, el valor medio empleando el punto de corte de 0,05 osciló entre 89 y 90% sin embargo, al usar un punto de corte menos estricto (0,1) la sensibilidad disminuyó a 83,5% (Álvarez *et al.*, 2012b). Otro estudio reciente sin *gold standard*, arrojó una estimación de la sensibilidad del test de 88,1% (IC 95%, 72,8-97,5) (Praud *et al.*, 2015). La especificidad del test de detección de IFN- γ evaluada en animales procedentes de distintos países osciló entre 94 y 100% (Wood & Jones, 2001), mientras que en otro trabajo el valor medio obtenido fue 96,6%, siendo el rango 85-99,6% según el estudio consultado (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). Empleando métodos analíticos en ausencia del *gold standard* la especificidad estimada fue de 85,7% y 90,3% (punto de corte de 0,05 y 0,1 respectivamente) (Álvarez *et al.*, 2012b), mientras que en otro estudio la especificidad fue inferior a los demás valores descritos anteriormente (62,3%, IC 95%, 60,2-64,5) (Praud *et al.*, 2015).

Cuando se ha realizado el test de detección de IFN- γ con antígenos alternativos a las PPDs, los resultados difieren en función del antígeno y la formulación seleccionados. Inicialmente, mostraron una buena especificidad, sobre todo en animales infectados con micobacterias ambientales (Pollock & Andersen, 1997). En un estudio en el que se realizó el test de detección de IFN- γ sobre animales reactivos a la IDTB, combinando el ESAT-6 con el

MPB70, la sensibilidad del test de detección de IFN- γ empleando las PPDs fue 89,3%, disminuyendo a 76,3% con el formato antigénico (Pollock *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando el test se realizó únicamente con el ESAT-6, las estimaciones de la sensibilidad oscilaron entre 69 y 88% (Aagaard *et al.*, 2010, Buddle *et al.*, 2001), mientras que empleando el CFP-10 se han descrito valores de sensibilidad ligeramente inferiores (entre 68 y 78%). Al usar los dos péptidos en la misma formulación en el test de detección de IFN- γ , la sensibilidad obtenida en un estudio realizado sobre animales reactivos a la IDTB fue de 77,9% (Vordermeier *et al.*, 2001). Por otra parte, la sensibilidad descrita en el test de detección de IFN- γ realizado utilizando el MPB70 como antígeno en animales de explotaciones con infección natural, fue inferior, ya que osciló entre 36 y 49% (Pollock *et al.*, 2000). Utilizando el Rv3615c se obtuvo una sensibilidad del 37%, y usando el Rv0899 la sensibilidad varió entre 50 y 85% (Aagaard *et al.*, 2006, Buddle *et al.*, 2013b, Sidders *et al.*, 2008). Con el fin de incrementar la sensibilidad del test se han realizado ensayos empleando formulaciones que incluían varios de los antígenos específicos. Al combinar ESAT-6 y CFP-10 la sensibilidad del test se incrementó hasta un 97% (Cockle *et al.*, 2006) y al emplear una formulación con ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, la sensibilidad estimada fue del 91% (Sidders *et al.*, 2008). Para valorar la especificidad del test de detección de IFN- γ con antígenos alternativos, en un trabajo realizado sobre 128 animales de explotaciones calificadas OTF, la especificidad con las PPDs fue de 92,2%, incrementándose a 99,2% al emplear el ESAT-6 con el MPB70 (Pollock *et al.*, 2000). Mientras que sobre animales libres y vacunados con *M. bovis* BCG, al emplear una formulación antigénica con ESAT-6 y CFP-10, la especificidad fue del 100% (Vordermeier *et al.*, 2001). En un estudio realizado sobre explotaciones con distinta situación epidemiológica y localización geográfica la especificidad del test de detección de IFN- γ realizado con una formulación que contenía ESAT-6 y CFP-10 fue del 85%, mientras que en otro estudio empleando la misma formulación fue de 93% (Cockle *et al.*, 2006), incrementándose hasta el 100% empleando estos dos antígenos junto con el Rv3615c (Sidders *et al.*, 2008). De forma similar a lo que ocurre en la IDTB, el empleo de antígenos alternativos incrementa la especificidad del test de detección de IFN- γ , sin embargo su limitada sensibilidad, reduce su empleo a determinadas situaciones epidemiológicas.

En el **ganado caprino** se han estudiado diversos factores que pueden afectar al resultado de este test diagnóstico (Bezós *et al.*, 2011b), aunque de manera genérica tanto el protocolo como el punto de corte empleados en esta especie, son los mismos que para el ganado bovino. El test de detección de IFN- γ presenta una sensibilidad muy variable que oscila entre 58 y 92%, habiéndose detectado diferencias en función del punto de corte y la situación epidemiológica del rebaño estudiado (Álvarez *et al.*, 2008, Bezós *et al.*, 2012a, Liébana *et al.*, 1998). La sensibilidad de test de detección de IFN- γ calculada sobre animales infectados de forma natural, seleccionados de distintos rebaños, fue del 83,7% (Gutiérrez *et al.*, 1998), siendo ligeramente inferior a la obtenida en otro trabajo realizado en condiciones

similares y empleando el mismo punto de corte, en el cual se obtuvo un valor de 91,6% (Marín, 1993). En otro estudio, la sensibilidad del test de detección de IFN- γ fue de 87,2%, valor ligeramente inferior al obtenido en otros trabajos, debido quizá a que se incluyó un porcentaje elevado de animales jóvenes (Liébana *et al.*, 1998). En un trabajo de Bezos y colaboradores, se realizó el test de detección de IFN- γ en muestras de animales infectados de manera natural, obteniendo una sensibilidad de 100% (punto de corte 0,05) que disminuyó a 94,1% con el punto de corte de 0,1 (Bezos *et al.*, 2011b). La especificidad del test de detección de IFN- γ en esta especie no se ha estudiado en detalle, siendo necesario realizar más trabajos al respecto, aunque existen estimaciones de entre 88 y 100% (Bezos *et al.*, 2011b, Broughan *et al.*, 2013b, Buendía *et al.*, 2013). En un estudio en el que se seleccionaron animales procedentes de rebaños con infección natural, la especificidad de test de detección de IFN- γ fue del 96% (Gutiérrez *et al.*, 1998), mientras que en otro anterior, la especificidad había llegado a ser del 100% (Marín, 1993).

En ganado caprino existe escasa información sobre el test de detección de IFN- γ realizado con muestras estimuladas con antígenos específicos, siendo los más empleados el ESAT-6 y el CFP-10. En los estudios que han valorado su aplicación, la sensibilidad obtenida fue similar a la descrita empleando las PPDs, mientras que la especificidad fue superior cuando se probaron en situaciones de vacunación frente paratuberculosis (Bezos *et al.*, 2011a, Domingo *et al.*, 2009, Pérez de Val *et al.*, 2012). Es necesario tener en cuenta que en la especie caprina la vacunación frente a la paratuberculosis es una práctica permitida, por lo que sería conveniente adaptar el protocolo de realización del test de detección de IFN- γ para su aplicación en esta especie (por ejemplo incluyendo antígenos específicos del MTBC en la estimulación de las sangres).

En los **camélidos de Sudamérica** existen escasos estudios realizados con el fin de evaluar el rendimiento obtenido con el test de detección de IFN- γ . En un trabajo publicado con muestras obtenidas de animales infectados de forma natural, y animales procedentes de explotaciones en las que nunca se había descrito la infección se obtuvo una sensibilidad del 57,7% y una especificidad de 89,1% (Rhodes *et al.*, 2012). Para incrementar el rendimiento de la prueba el protocolo que se emplea normalmente no contempla la estimulación de la sangre completa sino que es necesario realizar un paso previo para obtener las PBMCs y posteriormente estimularlas. Este sistema de obtención requiere de un equipamiento específico y es un proceso muy costoso, que tampoco ha logrado obtener resultados demasiado esperanzadores, por lo que el test de detección de IFN- γ en estos animales se realiza de manera muy ocasional. El empleo de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 en la estimulación de las PBMCs no resulta en una mejora en los valores de sensibilidad y especificidad con respecto a lo obtenido con las PPDs (Rhodes *et al.*, 2012).

En resumen, se asume que la sensibilidad del test de detección de IFN- γ es superior a la de la IDTB, sobre todo cuando se emplea la IDTB comparada (Collins *et al.*, 2000), en

parte debido a que se ha descrito que el test de detección de IFN- γ es capaz de detectar animales infectados entre 60–120 días antes que la IDTB comparada (Lilenbaum *et al.*, 1999b). Diversos estudios realizados en España, Irlanda y en Reino Unido demostraron que es más probable que un animal negativo a la IDTB y positivo al test de detección de IFN- γ esté infectado por *M. bovis* que cuando el animal es negativo a las dos pruebas diagnósticas (Álvarez *et al.*, 2014a, Coad *et al.*, 2008, Gormley *et al.*, 2006). Sin embargo se considera que en general el test de detección de IFN- γ es menos específico que la IDTB (Gormley *et al.*, 2013b), aunque en algún estudio se haya descrito lo contrario (Cagiola *et al.*, 2004).

1.3.2.2. Pruebas diagnósticas para la detección de la respuesta inmune de base humoral

La instauración de los programas de erradicación de tuberculosis en el ganado bovino ha conseguido disminuir la prevalencia de la enfermedad en las últimas décadas (Abalos & Retamal, 2004, de Kantor & Ritacco, 2006, Koller-Jones, 2010, Reviriego Gordejo & Vermeersch, 2006, Wobeser, 2009) e incluso se ha logrado su erradicación en determinadas zonas (Ryan *et al.*, 2006). Sin embargo, en ciertos países la prevalencia permanece constante (Anon, 2009a, EFSA, 2015, Wobeser, 2009), planteando cierta preocupación sobre la eficacia de las herramientas diagnósticas actuales (Álvarez *et al.*, 2014a, Humblet *et al.*, 2009) así como sobre la implicación de los veterinarios involucrados para la realización de las mismas (Humblet *et al.*, 2011a, Humblet *et al.*, 2011b) y de los ganaderos (Locke & Fishwick, 2011). Tanto la OIE como la OMS, han expresado la necesidad urgente de disponer de herramientas diagnósticas alternativas más eficaces.

Las pruebas de base humoral se basan en la detección de Ac frente a los miembros del MTBC, si bien actualmente no se contemplan como pruebas oficiales para el diagnóstico de la tuberculosis bovina ya que debido a la evolución natural de la infección en el hospedador (Pollock & Neill, 2002), no detectan animales infectados hasta las fases más avanzadas de la enfermedad (Ritacco *et al.*, 1991, Schiller *et al.*, 2010b). A pesar de esta teoría en algún trabajo realizado con animales infectados de forma experimental el título de Ac frente a ciertos antígenos fue positivo poco después de la infección de los animales (Waters *et al.*, 2006a). De cualquier forma la respuesta humoral es muy irregular y difiere según la variabilidad genética individual, la etapa de la infección y la exposición previa a micobacterias (Fifis *et al.*, 1994, Lightbody *et al.*, 2000). Además las pruebas de base humoral podrían tener una utilidad potencial como pruebas diagnósticas complementarias ya que su empleo en determinadas circunstancias y realizadas con muestras obtenidas después de efectuar la IDTB, incrementan su sensibilidad (Bezoz *et al.*, 2014b, Schiller *et al.*, 2010b), destacando también su valor como herramienta diagnóstica ya que en ocasiones son capaces de detectar animales anérgicos (Pollock *et al.*, 2005), incrementando la proporción de animales infectados detectados con

respecto a lo observado mediante la utilización de las pruebas de base celular (Bezoz *et al.*, 2014b, Schiller *et al.*, 2010b). Actualmente existe una amplia diversidad de formatos de pruebas de base humoral disponibles para el diagnóstico de la tuberculosis, aunque la principal prueba realizada es el ELISA basado en la detección de Ac frente MPB83 y MPB70 (Waters *et al.*, 2006b, Whelan *et al.*, 2008).

Inicialmente las pruebas de base humoral se diseñaron para la detección de Ac frente a la PPD bovina completa (Amadori *et al.*, 1998, Amadori *et al.*, 2002, Lilenbaum *et al.*, 1999a), ofreciendo resultados muy variables. En la actualidad hay varios antígenos frente a los cuales pueden generarse títulos cuantificables de Ac en animales infectados, siendo el MPB83 el más prometedor, ya que la respuesta inducida frente al mismo parece ser más precoz que frente a los demás antígenos estudiados (O'Loan *et al.*, 1994, Waters *et al.*, 2006b, Waters *et al.*, 2011a). El principal formato que se emplea para la detección de Ac es el ELISA, un inmunoensayo en el cual se detectan los Ac una vez unidos a un antígeno inmovilizado mediante un anti-Ac unido a una enzima capaz de generar una reacción cuantificable (un cambio de color, un aumento de la temperatura, etc.) (Cho *et al.*, 2007). Otra técnica empleada para la detección de Ac frente a tuberculosis es el *Multi-Antigen Print Immunoassay* (MAPIA) que permite detectar la presencia de Ac frente a varios antígenos simultáneamente, incrementando el rendimiento de las pruebas serológicas (Lyashchenko *et al.*, 2000). También se han empleado técnicas que detectan Ac frente a un único antígeno del MTBC, obteniendo resultados esperanzadores (Green *et al.*, 2009), así como un ELISA que a diferencia del MAPIA, emplea una técnica de quimioluminiscencia para detectar Ac de forma simultánea frente a varios antígenos presentes en la placa (Shuralev *et al.*, 2012, Whelan *et al.*, 2008). También existen diversos sistemas basados en técnicas de inmunocromatografía (*Lateral-flow assays*, también denominados *rapid test-RT*) empleados para el diagnóstico de tuberculosis en ganado bovino (Bermúdez *et al.*, 2012) y en fauna silvestre (Buddle *et al.*, 2010, Lyashchenko *et al.*, 2008, Michel & Simoes, 2009), que han ofrecido una sensibilidad muy variable en función de la especie analizada (Greenwald *et al.*, 2009). Por otra parte, los ensayos de aglutinación (*latex bead agglutination assay*) que detectan Ac frente a un único antígeno, han mostrado valores prometedores de sensibilidad y especificidad en animales infectados con tuberculosis y paratuberculosis (Koo *et al.*, 2004). Actualmente existe un nuevo formato que está en fase experimental, denominado ELISA de doble reconocimiento (DR-ELISA) que detecta Ac frente MP83; la novedad es que el antígeno está presente tanto inmovilizado tapizando la placa como en el conjugado, y permite reconocer otras inmunoglobulinas como la IgM además de la IgG, permitiendo que este ELISA detecte animales infectados recientemente (Venteo *et al.*, 2012).

Para realizar las pruebas de detección de Ac no es necesario estimular las muestras y por tanto éstas no tienen que llegar al laboratorio en un tiempo determinado tras su recogida. La muestra de partida puede ser teóricamente tanto suero como plasma y leche (Buddle *et*

al., 2013b). Las pruebas de detección de la respuesta humoral son en general pruebas rápidas (en el caso del *Lateral-flow assay* el resultado puede estar disponible incluso en menos de media hora), baratas y que permiten el análisis simultáneo de multitud de muestras. Su utilidad potencial en ganado bovino es mayor en situaciones crónicas de tuberculosis, ya que en este tipo de explotaciones la respuesta serológica ya debiera predominar en los animales infectados (Welsh *et al.*, 2005).

1.3.2.2.1. Rendimiento de las pruebas serológicas en rumiantes y camélidos de Sudamérica

Las pruebas de base humoral presentan en general valores de sensibilidad variables y de especificidad limitados. Además, es necesario tener en cuenta que sus resultados difieren dependiendo de si la toma de muestras se realizó antes o después de la inoculación de las PPDs, y también en función del formato que empleen.

La principal ventaja que presentan es que al usarse de manera combinada con la IDTB (realizando la prueba de base humoral tras haber inoculado las PPDs) se logra un aumento en la sensibilidad de las mismas, apareciendo un incremento del título de Ac específico (efecto *booster*), independientemente de la muestra empleada, que se ha descrito en ganado bovino infectado de manera natural (Waters *et al.*, 2011a) y experimental (Hanna *et al.*, 1992, Koo *et al.*, 2005, Palmer *et al.*, 2006, Waters *et al.*, 2006b, Waters *et al.*, 2015a), y también en búfalos infectados de forma natural (Zarden *et al.*, 2013). Además, este efecto *booster* también se ha observado en caprino (Gutiérrez *et al.*, 1998) y en camélidos de Sudamérica (Bezoz *et al.*, 2013). Este efecto se describió inicialmente en ganado caprino infectado de manera natural, en el cual la sensibilidad del ELISA para la detección de Ac frente a la PPD completa fue 54,9% (IC 95%, 41,4-67,7), incrementándose a 88,6% (IC 95% 76,0-95,1), cuando este se realizó con muestras recogidas 15 días tras la inoculación de las PPDs (Gutiérrez *et al.*, 1998).

Algunos estudios desarrollados en animales infectados de manera experimental, describen un efecto *booster* de mayor magnitud en aquellos individuos que presentan lesiones compatibles con la enfermedad (Lightbody *et al.*, 1998, Lightbody *et al.*, 2000). En un trabajo reciente realizado en ganado bovino infectados de manera experimental, se observó un doble efecto *booster*, ya que hubo un primer incremento del título de Ac con muestras recogidas tras haber realizado una IDTB en el pliegue caudal, y al ser sometidos estos animales a una IDTB comparada en la región cervical se observó un nuevo incremento de la respuesta serológica (Waters *et al.*, 2015a). Asimismo, se ha sugerido que las pruebas serológicas podrían ser capaces de detectar animales con tuberculosis activa y negativos a la IDTB (Plackett *et al.*, 1989, Waters *et al.*, 2011a).

No obstante, y desde un punto de vista logístico, la realización de otro muestreo tras haber realizado la IDTB requiere una nueva visita a la explotación, con lo que se encarece

mucho la técnica y plantea problemas de manejo del ganado adicionales. De cualquier forma, y como se ha comentado anteriormente, son pruebas que no detectan animales infectados recientemente, lo que ha imposibilitado hasta la fecha su uso de rutina en el marco de los programas de erradicación de la enfermedad.

En el **ganado bovino**, en un estudio en el que se realizó un ELISA para la detección de Ac frente a distintos antígenos presentes en *M. bovis*, la sensibilidad del mismo (calculada sobre 53 animales infectados) fue de 73,6% (Ritacco *et al.*, 1990). Sin embargo la sensibilidad del ELISA frente al antígeno MPB83 fue menor (37,5%), en un trabajo en el que se incluyeron muestras de animales infectados de manera experimental, animales reactivos a la IDTB procedentes de explotaciones infectadas y animales negativos (McNair *et al.*, 2001). En otro estudio se comparó el resultado de dos técnicas de base humoral (ELISA y *Lateral-flow assay*) empleando como antígenos el ESAT-6 y MPB70 individualmente. Con el ESAT-6 la sensibilidad del *Lateral-flow assay* fue 94,8% y 98,6% la del ELISA, mientras que empleando el antígeno MPB70 la sensibilidad del *Lateral-flow assay* fue 86,7% y la del ELISA fue 96,8%; además, el título de Ac se detectó antes empleando el ESAT-6 (Koo *et al.*, 2005). Al emplear un ensayo de quimioluminiscencia que detecta Ac de manera simultánea frente a 25 antígenos del MTBC, la sensibilidad de la prueba humoral con muestras de animales infectados, fue 93,1% (Whelan *et al.*, 2008). En un trabajo reciente, se evaluó el rendimiento de un ELISA experimental que emplea *M. bovis* inactivado mediante etanol como antígeno inmovilizado en la placa, alcanzando una la sensibilidad de 77,2% (Wadhwa *et al.*, 2014). Otro estudio basado en la detección de Ac frente MPB70 y MPB83 en un ELISA con suero y leche, arrojó valores de sensibilidad del 50% independientemente del tipo de muestra analizada (Buddle *et al.*, 2013b). Los valores de especificidad de las técnicas serológicas en rumiantes han sido en general limitados. Al evaluar el ELISA basado en la detección de Ac frente a varios antígenos de *M. bovis*, el valor de especificidad fue de 94,1%, calculada sobre 101 animales en los que no se confirmó la infección ni se detectaron lesiones compatibles (Ritacco *et al.*, 1990). Mientras que al emplear como antígeno el MPB83, la especificidad fue ligeramente inferior, siendo del 89% en animales procedentes de explotaciones libres de tuberculosis (McNair *et al.*, 2001). En el mismo estudio en el que se comparó el resultado del ELISA y del *Lateral-flow assay* empleando el ESAT-6 y el MPB70, con el ESAT-6 la especificidad del *Lateral-flow assay* y del ELISA fue de 92,6% y 98,5% respectivamente, mientras que con MPB70 fue de 97,8% y 90,1% (Koo *et al.*, 2005). En otro trabajo en el que se empleó un ensayo de quimioluminiscencia que detecta Ac de manera simultánea frente a 25 antígenos del MTBC, se obtuvo una especificidad de 98,4% en muestras de animales no infectados (Whelan *et al.*, 2008). Cuando se realizó un ELISA que detecta Ac conjuntamente frente a MPB70 y MPB83 con muestras de leche, la especificidad descrita fue del 97,5% (Buddle *et al.*, 2013b).

En el **ganado caprino**, las pruebas de base humoral pueden resultar una opción atractiva debido al menor número de reacciones cruzadas observadas en animales infectados

con miembros que no pertenecen al MTBC utilizando ciertos antígenos como el MPB70 en pruebas serológicas. Tal y como sugieren los resultados obtenidos en ganado bovino con paratuberculosis (Amadori *et al.*, 2002, Harboe *et al.*, 1990). En un estudio realizado antes y 15 días después de una IDTB comparada en animales procedentes de rebaños es los que se había confirmado la infección, la sensibilidad del ELISA para la detección de Ac frente a la PPD bovina completa fue 54,9%, incrementándose a 88,6% al analizar muestras recogidas tras la IDTB (Gutiérrez *et al.*, 1998). Siendo valores inferiores a los obtenidos en otro trabajo empleando también la PPD bovina como antígeno, en el cual la sensibilidad alcanzada fue de 93,4% (Acosta *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando se usó un ELISA para la detección de Ac frente al antígeno MPB70, la sensibilidad del mismo fue superior, con un valor de 95,6% (IC 95%, 85,2-98,8) (Marassi *et al.*, 2009), aunque en otro trabajo, al emplear un ELISA para la detección de Ac frente al mismo antígeno, se alcanzó una sensibilidad del 66,3% (IC 95%, 56,7-74,8) (Buendía *et al.*, 2013). Debido quizá a que en el segundo trabajo se seleccionaron animales procedentes de varias explotaciones con distinta prevalencia de la enfermedad, pudiendo afectar al rendimiento del ELISA. En otro estudio en el que se empleó un ensayo de quimioluminiscencia, la sensibilidad de la prueba humoral fue de 95% y 100% (con muestras de explotaciones diferentes en las que se identificó *M. bovis*) utilizando la IDTB comparada como prueba de referencia. Además en el mismo estudio se analizaron muestras procedentes de animales infectados con *M. caprae*, obteniendo el ensayo una sensibilidad inferior, con un valor de 85,7% (Shuralev *et al.*, 2012). En ganado caprino, la especificidad se evaluó también en un estudio realizado con muestras recogidas antes y 15 días después de la IDTB comparada en animales procedentes de distintos rebaños es los que se había confirmado previamente la infección. La especificidad del ELISA para la detección de Ac frente a la PPD bovina fue de 88%, incrementándose a 95,8% realizado con las muestras recogidas tras la IDTB (Gutiérrez *et al.*, 1998). Siendo inferior a la especificidad alcanzada con el ensayo de quimioluminiscencia que detecta Ac de manera simultánea frente a distintos antígenos del MTBC, ya que fue del 100% (Shuralev *et al.*, 2012).

En los **camélidos de Sudamérica** los estudios sobre el rendimiento de las pruebas de base humoral se han realizado con un reducido número de animales que oscila entre 1 y 33 (Álvarez *et al.*, 2012a). Además, es necesario destacar que los Ac de los camélidos carecen de cadena ligera, hecho que puede influir en un menor rendimiento en las pruebas serológicas, ya que se ha descrito que la capacidad de unión antígeno-Ac puede verse comprometida debido a esta peculiaridad (Muyldermans, 2001). En animales infectados de manera natural con *M. microti* la sensibilidad descrita osciló entre 62,5 y 87,5% (Lyashchenko *et al.*, 2007), mientras que en casos de infección por *M. bovis* los resultados de sensibilidad obtenidos fueron superiores, oscilando entre 64,3 y 100% (Dean *et al.*, 2009, Wernery *et al.*, 2007). En otro estudio realizado con muestras de animales infectados de forma natural por *M. bovis*, se realizó un DR-ELISA en fase experimental con suero recogido antes y 15, 30 y 42 días tras la

IDTB. Se obtuvo un incremento en la respuesta humoral (efecto *booster*), que llegó a alcanzar una sensibilidad del 100% con muestras obtenidas 15 y 30 días tras la IDTB (Bezós *et al.*, 2013). Las estimaciones de especificidad obtenida en animales libres de la enfermedad oscilan entre 87,9 y 100% en función del estudio consultado (Lyashchenko *et al.*, 2007). Rhodes y colaboradores evaluaron la especificidad de diversas pruebas de base humoral, alcanzando unos valores entre 96,4 y 97,4% (Rhodes *et al.*, 2012). Mientras que en otro trabajo desarrollado con el DR-ELISA experimental con muestras obtenidas antes y después de la IDTB, la especificidad alcanzada fue del 100%, independientemente del momento de extracción de la muestra, la dilución y del punto de corte empleados (Bezós *et al.*, 2014c).

1.3.3. Pruebas diagnósticas basadas en la detección del agente

Dentro de esta categoría se incluyen distintas técnicas disponibles para detectar la presencia del patógeno en el hospedador.

1.3.3.1. Diagnóstico microscópico

La microscopía directa es un método sencillo, rápido y económico para la detección de la micobacteria en la muestra clínica. La muestra puede proceder tanto de un animal vivo (muestras de esputos o lavados traqueobronquiales) como de un animal sacrificado (muestras recogidas en matadero, o al realizar la necropsia). Como ya se comentó anteriormente, las micobacterias se clasifican como Gram positivas pero desde un punto de vista estricto no retienen el colorante violeta de genciana, y por este motivo para su tinción es necesario emplear colorantes específicos como el Ziehl-Neelsen o la auramina (Holani *et al.*, 2014) (Figura 9). Las principales limitaciones de este método diagnóstico es que requiere de una elevada carga bacteriana y que es poco específico (en la muestra se observan bacilos ácido-alcohol resistentes pero no se puede concluir si pertenecen al MTBC), siendo por tanto una técnica menos sensible y específica que el cultivo microbiológico. Asimismo, cuando se emplea la tinción de auramina es necesario disponer de un microscopio de fluorescencia.

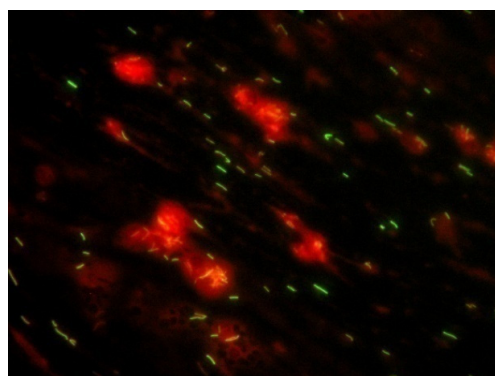


Figura 9. Tinción de micobacterias sobre una extensión de muestra de tejido pulmonar empleando el colorante específico auramina.

1.3.3.2. Diagnóstico macroscópico

El diagnóstico macroscópico consiste en la observación de lesiones compatibles con tuberculosis al realizar la necropsia del animal. Es necesario inspeccionar toda la canal, haciendo especial hincapié en los órganos que suele afectar esta enfermedad, linfonodos y órganos parenquimatosos, principalmente el pulmón (Whipple *et al.*, 1996). Mediante la observación macroscópica no es posible confirmar la infección, ya que existen otras patologías que pueden producir lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis [perineumonía contagiosa bovina, leucosis bovina, mastitis (aunque no es frecuente que se localicen lesiones), actinobacilosis, actinomicosis, pseudotuberculosis (sobre todo en pequeños rumiantes) (Brown & Olander, 1987), y en general cualquier proceso patológico que pueda afectar a las vías respiratorias superiores]. Debido a las limitaciones que presenta el diagnóstico macroscópico, en jabalíes infectados de forma natural se ha estimado que hasta el 17,3% de animales infectados pueden llegar a clasificarse como negativos (Martín-Hernando *et al.*, 2007). Mientras que en un estudio realizado en ganado bovino, se puso de manifiesto que hasta un 47% de animales con lesiones pasan desapercibidos en el matadero (Corner *et al.*, 1990).

El desarrollo de lesiones macroscópicas se produce en fases avanzadas de la infección, por lo que normalmente los animales infectados recientemente a pesar de ser positivos a las pruebas diagnósticas, no presentan lesiones en el matadero o si están, son difícilmente observables (Pollock & Neill, 2002). En Irlanda y en Reino Unido se estima que aproximadamente entre el 50 y 80% de los animales reactivos a la IDTB no presentaron lesiones en el matadero (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001, Tweddle & Livingstone, 1994). Se considera también que el porcentaje de reactivos al test de detección de IFN- γ que presentan lesiones es inferior al descrito en el caso de la IDTB, ya que al ser un test más sensible detecta animales infectados precozmente, en los cuales la probabilidad de poder haber desarrollado lesiones compatibles con tuberculosis es aún menor (Pollock & Neill, 2002). Por otra parte, se ha sugerido que existe cierta relación entre el incremento del grosor de piel obtenido en la IDTB y la extensión de las lesiones presentes en el hospedador (Clifton-Hadley & Goodchild, 2005). De igual forma, se ha correlacionado la cantidad de IFN- γ detectado en el test con una mayor severidad de lesiones desarrolladas en el animal (Hope *et al.*, 2011).

1.3.3.3. Diagnóstico histológico

El diagnóstico histológico consiste en la observación anatomopatológica del granuloma tuberculoso, localizado normalmente en el pulmón y/o en los linfonodos bronquiales y mediastínicos. Los granulomas son formaciones de carácter inflamatorio productivo, por lo común de 1 a 2 mm de diámetro, formados por células de carácter

inflamatorio como macrófagos, células gigantes de Langhans y linfocitos (Davis & Ramakrishnan, 2009) (Figura 10).

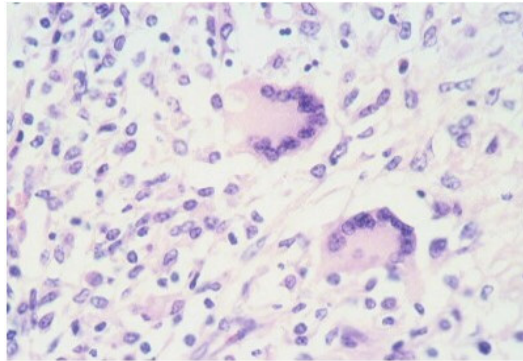


Figura 10. Granuloma tuberculoso pulmonar. Entre la capa de células epiteloides y linfocitaria se aprecia la presencia de células gigantes multinucleadas de distribución periférica (células de Langhans).

1.3.3.4. Diagnóstico microbiológico

Como ya se comentado anteriormente, el cultivo microbiológico es la técnica diagnóstica de referencia (*gold standard*) para confirmar la existencia de la enfermedad (OIE, 2009). La principal limitación que presenta esta técnica es que la probabilidad de obtener un cultivo positivo de un animal infectado es mayor si se parte de muestras con lesiones compatibles, llegando hasta el 85% (Courcoul *et al.*, 2014, Gormley *et al.*, 2014), pero su sensibilidad es muy limitada en las fases tempranas de la infección, siendo difícil confirmar la enfermedad. El cultivo microbiológico puede hacerse a partir de muestras recogidas *in vivo* o al realizar la necropsia del animal. Al ser una enfermedad zoonótica, el cultivo microbiológico de cualquier muestra potencialmente infectada con cualquier especie incluida en el MTBC debe realizarse en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (WHO, 2012).

Para realizar el cultivo por cada animal analizado se prepara una mezcla de las muestras con lesiones si las hubiera, o en caso contrario de todos los tejidos muestreados (linfonodos y órganos parenquimatosos). Posteriormente, la muestra se descontamina (Corner & Trajstman, 1988, Wilton & Cousins, 1992) y se siembra el sedimento en medios específicos para el crecimiento de micobacterias [normalmente Coletsos y Lowenstein-Jensen en el caso del cultivo en medio sólido, y MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*) o MB Redox en el caso de cultivo en medio líquido]. El aspecto macroscópico de las colonias es distinto en función de la especie de micobacteria (Figura 11).

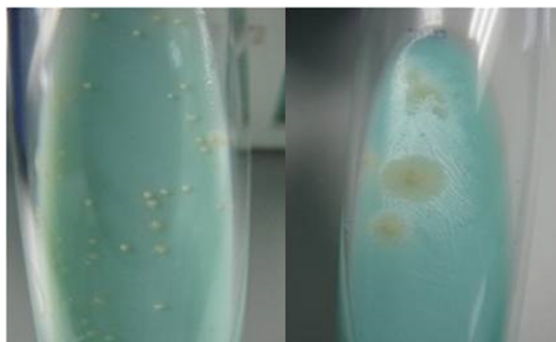


Figura 11. Medios de cultivo sólidos con crecimiento compatible con micobacterias.

Dado el metabolismo lento de las bacterias del MTBC, el periodo de tiempo necesario para observar colonias en el medio sólido puede ser de hasta tres meses (reduciéndose este periodo en el caso de medios líquidos a aproximadamente la mitad). En este sentido, la introducción de sistemas de detección automática o semiautomática de micobacterias en la década de los ochenta revolucionó el cultivo de estos microorganismos, mejorando la recuperación de todo tipo de micobacterias y disminuyendo considerablemente el tiempo de detección de las mismas (Koh *et al.*, 2012). Además, este tipo de sistemas presentan otras ventajas como son la automatización, la sencillez y la disminución del riesgo de contaminación cruzada entre muestras al tener métodos de detección que no implican una manipulación del contenido de los tubos. Su principal limitación es la económica, ya que los medios que se emplean para el cultivo en medio líquido son mucho más caros en comparación con los que se usan en el medio sólido. Inicialmente estos sistemas se desarrollaron para su empleo en medicina humana con el fin de realizar un diagnóstico precoz para poder así comenzar con el tratamiento profiláctico, pero su empleo en medicina veterinaria es cada vez más frecuente. La Figura 12 muestra una imagen del sistema automatizado empleado para la incubación de las micobacterias en medio líquido (Sistema *BACTECTM MGIT™ 960*, *Becton Dickinson, USA*).



Figura 12. Sistema *BACTECTM MGIT™ 960* (*Becton Dickinson, USA*) empleado para la incubación de micobacterias en medio de cultivo líquido.

El hecho de que el cultivo microbiológico sea hasta la fecha la única técnica de referencia para confirmar la infección y pueda requerir de hasta tres meses para la obtención de un resultado definitivo, complica enormemente la gestión práctica en caso de sospecha de brotes de tuberculosis en explotaciones de ganado bovino. Durante el periodo de tiempo transcurrido desde la detección de los animales reactores hasta la confirmación de la infección (o de la ausencia de la misma) la explotación potencialmente infectada se ve sometida a restricciones en el movimiento de animales, lo que puede dar lugar a pérdidas económicas a los ganaderos.

Una vez detectado el crecimiento en los medios de cultivo, la presencia de un miembro de MTBC se confirma normalmente mediante la detección de fragmentos específicos de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*: PCR) (Wilton & Cousins, 1992) y posteriormente mediante técnicas moleculares se identifica la cepa. Las técnicas moleculares más utilizadas para la realización de estudios epidemiológicos son el *direct variable repeat spacer oligonucleotide typing (DVR-spoligotyping)* (Kamerbeek *et al.*, 1997, van Embden *et al.*, 2000)] o el análisis de repeticiones en tándem de múltiples loci (*VNTR typing*) (Frothingham & Meeker-O'Connell, 1998, Skuce *et al.*, 2002, Supply *et al.*, 2000). Ambas técnicas moleculares se basan en la presencia o ausencia de regiones concretas del genoma de las micobacterias, y ponen en evidencia diferencias entre cepas distintas dentro de una misma especie.

El *DVR-spoligotyping* está dirigido a una región de repeticiones directas intercaladas por secuencias únicas, denominadas espaciadores, y revela la presencia o ausencia de estos espaciadores. El resultado es un perfil de espoligo que puede presentarse como código numérico binario y al que además se puede asignar un nombre de acuerdo con la nomenclatura internacional (prefijo SB seguido por 4 números, por ejemplo SB0121) (www.mbovis.org) (Smith & Upton, 2012). El *VNTR typing* analiza diferentes *loci* en el genoma, y consiste en la determinación del número de secuencias repetidas en cada una de ellas, de modo que el resultado se presenta como una combinación de los números de repeticiones en los *loci* analizados.

1.3.3.5. Diagnóstico mediante PCR directa [*Real time*-PCR (RT-PCR)]

El diagnóstico mediante PCR directa puede hacerse a partir de muestras recogidas *in vivo* o en muestras recogidas al realizar la necropsia del animal (preferentemente lesiones, si las hubiera). Es una técnica diagnóstica que se encuentra en fase experimental y que hasta la fecha parece ofrecer menor sensibilidad que el cultivo microbiológico tradicional (Gormley *et al.*, 2014), aunque en determinados casos puede ser superior al cultivo ya que la sensibilidad también varía en función de si en la muestra de partida hay lesiones compatibles con la enfermedad, oscilando entre un 61,1% y 90,9% en ausencia y presencia de lesiones

respectivamente (Courcoul *et al.*, 2014, Parra *et al.*, 2008). La principal ventaja que presenta es que acorta el periodo de tiempo necesario para la confirmación de la infección, ya que no es necesario esperar a que se produzca crecimiento de la bacteria en medios específicos. En el caso de la enfermedad en el ser humano el diagnóstico precoz acelera el tratamiento terapéutico y en el caso del bovino acortaría los intervalos entre pruebas diagnósticas limitando el contagio de nuevos animales en la explotación (Courcoul *et al.*, 2014) y el periodo durante el cual se imponen restricciones en el movimiento de animales, con el consiguiente beneficio para los ganaderos.

1.4. FACTORES QUE INTERFIEREN EN EL DESARROLLO Y/O EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD EN ANIMALES

La tuberculosis se ha descrito en prácticamente todas las especies domésticas (Broughan *et al.*, 2013a, Broughan *et al.*, 2013b) y en multitud de animales silvestres (Palmer, 2013). En todos, el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad están definidos principalmente por la susceptibilidad del huésped, los mecanismos de virulencia del agente patógeno, la dosis infectiva y la vía de entrada de la micobacteria. Asimismo, existen multitud de factores que pueden afectar tanto a la realización de la IDTB como al test de detección de IFN- γ y por ende a su resultado, clasificando erróneamente tanto animales infectados como sanos (Allepuz *et al.*, 2011, Álvarez *et al.*, 2014a, Humblet *et al.*, 2009).

Los fallos diagnósticos que comprometen la sensibilidad de la prueba, contribuyen al mantenimiento de la infección (Barlow *et al.*, 1997) y favorecen la diseminación del patógeno en la misma u otras explotaciones, mediante el movimiento de animales infectados negativos a las pruebas diagnósticas. En ocasiones la caracterización molecular de *M. bovis*/*M. caprae* ha demostrado la reaparición de cepas con perfiles idénticos en las mismas explotaciones tras sucesivas campañas (de la Cruz *et al.*, 2014), sugiriendo que en determinadas ocasiones la infección no se logró erradicar, bien porque no se detectaron todos los animales infectados (Álvarez *et al.*, 2012b), porque la micobacteria permaneció en el entorno (Courtenay *et al.*, 2006) o porque la fauna silvestre actuó como reservorio (Corner, 2006). Por otra parte, el avance de los programas de erradicación conduce con el tiempo a un descenso en la prevalencia de la enfermedad, lo que con frecuencia produce una mayor variabilidad en el rendimiento de las pruebas diagnósticas debido a la mayor proporción de animales infectados que estarán en fases iniciales de la enfermedad. Situación en la cual se ha descrito que la eficacia de las técnicas de diagnóstico es más limitada (Álvarez *et al.*, 2012b).

1.4.1. Factores relacionados con el hospedador

La variabilidad individual es un factor decisivo en la progresión de la enfermedad tras la infección y puede ser determinante para contenerla y/o superarla en caso de que ésta se

desarrolle. Además, existen diversos parámetros relacionados con el hospedador que pueden alterar el resultado de las pruebas diagnósticas, y por ende su rendimiento.

Estado del sistema inmune: Es necesario un sistema inmune competente y maduro para que el animal puede hacer frente al patógeno e impedir su diseminación cuando la infección tiene lugar. Por este motivo cualquier factor que afecte al estado del mismo incrementa el riesgo de infección y puede modificar el resultado de las pruebas diagnósticas (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). Diversos estudios han puesto de manifiesto que situaciones de desequilibrio metabólico comprometen el estado del sistema inmune. En hembras próximas al parto y/o en las semanas posteriores al mismo se ha descrito un periodo de desensibilización a las pruebas de base celular originando reacciones negativas a la IDTB en animales infectados (Kehrli *et al.*, 1989, Kerr *et al.*, 1946a, Kerr *et al.*, 1946b). Asimismo, en cobayas sensibilizadas con la vacuna *M. bovis* BCG se ha demostrado que la administración de tiroxina incrementa la respuesta frente a la IDTB (Long *et al.*, 1950). Este hecho parece indicar que en el caso de deficiencia de tiroxina la respuesta a la IDTB podría verse disminuida, si bien este hallazgo no se ha demostrado en ganado bovino.

Incluso en situaciones en las que la respuesta inmune es adecuada, en animales con infección latente y lesiones tuberculosas encapsuladas se ha descrito que la respuesta inmune disminuye, debido al insuficiente estímulo antigénico derivado del aislamiento de la micobacteria, lo que puede conducir a una respuesta negativa en estos animales a pesar de estar infectados (Lamont, 1947, Olea-Popelka *et al.*, 2008). Como ya se ha comentado en el apartado de respuesta inmune frente a la tuberculosis, también es necesario un periodo de tiempo mínimo tras el contacto inicial con el antígeno para que se produzca la activación y diferenciación de los linfocitos (periodo de pre-alergia), mientras que después de un periodo de tiempo muy prolongado tras la infección puede tener lugar un fenómeno de anergia. Por tanto, los principales fallos diagnósticos en relación con el estado sistema inmune se asocian con la realización de las pruebas en el periodo de pre-alergia, antes de que se produzca una respuesta inmune detectable en el animal infectado (Buddle *et al.*, 1995, Lilenbaum *et al.*, 1999b, Pollock & Neill, 2002) o en el periodo anérgico, en el cual un animal infectado no responde a las pruebas diagnósticas de base celular (Lepper *et al.*, 1977b).

Condición corporal: la condición corporal es un parámetro que indica el estado general del animal y que es determinante en los procesos reproductivos del ganado bovino (Bohnert *et al.*, 2013). Este parámetro también se ha relacionado en procesos patológicos como la tuberculosis, ya que una condición corporal adecuada se asocia normalmente con un sistema inmune competente, esencial para el control de la infección. La condición corporal de los animales criados en intensivo es en general superior a la de aquellos mantenidos en extensivo, siendo los últimos más susceptibles a la infección (Francis, 1947). En África, se ha

relacionado una baja condición corporal con un mayor riesgo de respuesta positiva a la IDTB (Cook *et al.*, 1996). Asimismo en otro trabajo realizado en Irlanda se comprobó que la resistencia frente la enfermedad era menor en animales que presentaban baja condición corporal (Griffin *et al.*, 1993b).

Edad: la realización de las pruebas diagnósticas en animales menores de seis semanas en el caso de la IDTB y menores de seis meses en el caso del test de detección de IFN- γ (Gormley *et al.*, 2013b) puede dar lugar a la aparición de reacciones inespecíficas debido al desarrollo insuficiente del sistema inmune del animal (Mackay *et al.*, 1989). Además la edad avanzada es un factor de inmunosupresión que compromete la eficacia del sistema inmune, hecho que favorece la infección (Ameni *et al.*, 2007, Brooks-Pollock *et al.*, 2013) y que se asocia en general con un aumento de los fallos diagnósticos (Munroe *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Griffin y colaboradores, en Irlanda en 2.000 animales procedentes de 200 explotaciones, se observó que aquellos menores de seis meses tenían menor probabilidad de reaccionar a la IDTB (Griffin *et al.*, 1993b). En otro trabajo se concluyó que a medida que la edad del animal aumenta se incrementa el riesgo de obtener respuestas positivas a la IDTB (Ramirez-Villaescusa *et al.*, 2009). La edad juega también un papel importante en el rendimiento de las pruebas diagnósticas, porque a medida que la edad del animal aumenta se incrementa la probabilidad de que animales infectados sean negativos en la IDTB (Cagiola *et al.*, 2004), en el test de detección de IFN- γ (Gormley *et al.*, 2013b), o en ambas pruebas diagnósticas de base celular (Álvarez *et al.*, 2014a).

Sexo: en ratones infectados de forma experimental con *M. tuberculosis* se ha comprobado que los machos son más susceptibles a la enfermedad que las hembras, hallazgo relacionado con el efecto negativo de la testosterona sobre la activación macrofágica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Así, se demostró que machos castrados tenían una menor susceptibilidad a la enfermedad que aquellos sin castrar (Bini *et al.*, 2014).

En el ganado bovino, las posibles diferencia entre ambos géneros podrían estar relacionadas con el manejo de los animales en función del sexo (Humblet *et al.*, 2009). En un estudio realizado en África y de acuerdo a lo observado en ratones, se puso de manifiesto que el riesgo de padecer la enfermedad era significativamente superior en machos (Kazwala *et al.*, 2001), debido quizá a que en general éstos se emplean como bueyes, manteniéndose en la explotación durante toda su vida productiva e incrementando el riesgo de infección. Sin embargo otro estudio también realizado en África, reveló que la proporción de animales positivos a la IDTB fue significativamente superior en hembras (Inangolet *et al.*, 2008).

Estrés: cuando los animales se someten a situaciones de estrés (manejo, transporte, etc.) se liberan glucocorticoides que suprimen varios mecanismos de interacción del sistema inmune (Brown *et al.*, 1998, Kerr *et al.*, 1946a, Kerr *et al.*, 1946b, Roth & Kaeberle, 1985a, Roth, 1985b,

Roth & Goff, 1989) con lo que podría comprometerse el rendimiento de las pruebas diagnósticas. Inicialmente este efecto se comprobó en cobayas sensibilizadas de manera experimental con *M. bovis* BCG en las que la administración de cortisol (hormona liberada en situaciones de estrés) disminuía la respuesta a la IDTB (Long *et al.*, 1950).

En un estudio realizado para valorar el efecto del estrés sobre la IDTB y el test de detección de IFN- γ en ganado bovino, se administró un glucocorticoide sintético en 18 animales sensibilizados y 8 animales infectados de forma natural con *M. bovis*. Aquellos que recibieron el fármaco presentaron respuestas intradérmicas significativamente inferiores en la IDTB así como una disminución de los valores de DO en el test de detección de IFN- γ , clasificando erróneamente ambas pruebas animales infectados como negativos (Doherty *et al.*, 1995b). En otro estudio realizado en cuatro animales infectados de forma natural, se extrajo sangre antes y después de la administración del mismo glucocorticoide sintético para valorar su respuesta al test de detección de IFN- γ . Todos los animales fueron positivos antes del tratamiento mientras que se observó una disminución de los valores de DO registrada en las muestras recogidas después del tratamiento que supuso un descenso de la sensibilidad de la prueba (Doherty *et al.*, 1995b, Goff, 1996). En otro trabajo en el que se empleó la misma sustancia en tres animales infectados de manera experimental se comprobó que el resultado de la prueba de detección de IFN- γ se fue negativo durante los ocho días posteriores al tratamiento con el fármaco (Dondo *et al.*, 1996). En otro ensayo se recogió sangre en el matadero en dos momentos (antes del aturdimiento y tras su sacrificio) de 12 animales sensibilizados frente *M. bovis* para comparar los resultados en el test de detección de IFN- γ . El estrés generado se asoció con una disminución de los valores de DO y un resultado negativo en la prueba (Okafor *et al.*, 2012). El mismo efecto se observó en un trabajo en el que se recogieron las muestras de sangre de animales infectados de forma natural en el matadero: los valores de DO obtenidos en el test de detección de IFN- γ fueron inferiores comparados con los resultados obtenidos en otros animales muestreados en la explotación (Schiller *et al.*, 2009), atribuyéndose al estrés del manejo y del transporte.

En general el efecto del estrés en la IDTB ha sido escasamente documentado, lo que hace recomendable profundizar en este tema ya que algunos animales (principalmente las razas criadas en régimen extensivo) son muy sensibles al estrés inherente al manejo al que se ven sometidos para realizar la prueba (Keck *et al.*, 2012). También se ha descrito un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad en las razas de aptitud láctea, asociado al mayor estrés que se produce durante el ordeño (Barlow *et al.*, 1997).

Especie hospedadora: como se ha comentado anteriormente, los miembros del MTBC presentan cierta preferencia en cuanto a su hospedador. De acuerdo a la literatura científica, cuando algún miembro del MTBC se identifica en una especie no considerada como su hospedador más frecuente, la enfermedad cursa con un cuadro de lesiones más limitado y

una menor tasa de excreción (Ameni *et al.*, 2013). La susceptibilidad a *M. tuberculosis* es relativamente alta en primates y cobayas, mientras que el ganado bovino, los conejos y los gatos son más susceptibles a *M. bovis* y más resistentes a *M. tuberculosis* (LoBue *et al.*, 2010). Los ungulados silvestres suelen ser más sensibles a *M. bovis* que a *M. tuberculosis*, hecho que puede ser debido a una mayor similitud con el ganado bovino (principal especie hospedadora de *M. bovis*). Los camélidos de Sudamérica han demostrado ser altamente susceptibles a la enfermedad cuando la infección está causada por *M. microti* o *M. bovis* (García-Bocanegra *et al.*, 2010, Ryan *et al.*, 2008, Twomey *et al.*, 2012).

A pesar de que se ha aislado la enfermedad en la mayoría de especies animales, en alguna como el cebú (*Bos indicus*) o la oveja (*Ovis aries*) se ha especulado con la existencia de una cierta resistencia genética natural, si bien dicha resistencia no sería total (Ameni, 2009, Muñoz Mendoza *et al.*, 2012). Se ha asociado una menor resistencia con mutaciones en el gen *Nramp1* (*natural resistance-associated macrophage protein 1*), que incrementarían la susceptibilidad a la infección en el hospedador (Newport *et al.*, 1995). El correcto funcionamiento de este gen es indispensable para conseguir el ambiente ácido necesario en el interior del fagolisosoma para lograr la destrucción de las micobacterias (Barthel *et al.*, 2000, Domenech *et al.*, 2002). En el ganado bovino se han realizado diversos estudios con el fin de determinar la frecuencia alélica de este gen, lo que podría ser útil en el diseño de futuras alternativas para el control de la enfermedad basadas en la selección genética de animales resistentes (Paixao *et al.*, 2006). En alguna otra especie animal como los cérvidos se ha descrito una elevada heredabilidad de la resistencia frente a la infección tuberculosa, no pudiéndose relacionar este hecho con diferencias en el gen *Nramp1* (Mackintosh *et al.*, 2000).

Aptitud: se han demostrado que la aptitud y a la raza (parámetros muy relacionados) pueden estar asociados con la existencia de diferencias determinantes en la evolución de la infección en el ganado bovino (le Roex *et al.*, 2013a, le Roex *et al.*, 2013b, Tsairidou *et al.*, 2014, Vordermeier *et al.*, 2012). Cada raza, destinada para una aptitud determinada en función de sus capacidades productivas, se explota mediante un sistema de manejo concreto, por lo que en ocasiones es difícil determinar si las diferencias observadas se deben a la raza, a la aptitud, o al sistema de manejo de los animales (Humblet *et al.*, 2009). A nivel nacional el ganado de aptitud láctea se mantiene normalmente en un régimen intensivo o semi-extensivo, mientras que el ganado de aptitud cárnica y el ganado de lidia se explotan normalmente a través de un régimen extensivo. Además, en el ganado de carne hay que diferenciar los animales de cebo, animales menores de dos años que se mantienen normalmente en corrales (denominados cebaderos) con limitadas salidas a pasto, del resto.

En un estudio realizado por Omer y colaboradores, en África se comprobó que las razas autóctonas de cebú eran más resistentes a la enfermedad en comparación con las razas importadas para mejorar el rendimiento de la aptitud láctea (Omer *et al.*, 2001), lo que fue

posteriormente confirmado en otro estudio desarrollado también en África (Elias *et al.*, 2008). Debe tenerse en cuenta que estos estudios comparan distintas razas con el cebú, que presenta una singularidad genética en el gen *Nramp1* que podría explicar en parte las diferencias observadas. En otro trabajo realizado por Munroe y colaboradores, en Canadá durante nueve años, no se encontraron diferencias en el riesgo de enfermedad entre ganado de aptitud láctea y cárnica, si bien es cierto que el número de animales de leche incluidos en dicho trabajo fue menor, y pudo sesgar los resultados obtenidos (Munroe *et al.*, 1990).

Los fallos diagnósticos relacionados con la raza pueden deberse a problemas en el propio manejo de la misma, principalmente en el caso de la IDTB, ya que requiere que el animal esté relativamente inmovilizado. El manejo se puede considerar por tanto punto crítico para la realización de la prueba, siendo complicado en determinadas razas, sobre todo cuando no se dispone de las instalaciones necesarias. En un estudio realizado en nuestro país comparando la proporción de animales infectados negativos a la IDTB y/o el test de detección de IFN- γ en bovino de carne, leche y lidia, los animales de lidia presentaron una mayor proporción de falsos negativos en las dos pruebas diagnósticas, seguido del ganado de carne y por último el ganado de leche (Álvarez *et al.*, 2014a). En el caso de la IDTB el resultado se podría justificar por una inadecuada realización de la misma (particularmente difícil de realizar en el ganado de lidia), pero también a una mayor carga de estrés en los animales de esta aptitud durante la realización de la prueba (Keck *et al.*, 2012). Otra posible explicación radicaría en la existencia de más animales en fases avanzadas de enfermedad en la aptitud de lidia en comparación con las otras razas. En otro trabajo también se puso de manifiesto que los valores de DO obtenidos por ganado de lidia de Francia infectado de manera natural fueron inferiores comparado con animales de otras aptitudes (Schiller *et al.*, 2009).

También se han descrito casos en los que la aptitud del ganado bovino se relaciona con problemas de especificidad, como se puso de manifiesto en un estudio realizado en Italia en el que se asoció un mayor porcentaje de falsos positivos en el test de detección de IFN- γ en animales de aptitud cárnica (principalmente animales procedentes de cebaderos) comparado con los resultados obtenidos en ganado de leche (Cagiola *et al.*, 2004). Sin embargo, resultados contradictorios se describieron en otro trabajo en el que no se pudo asociar la aptitud con una mayor probabilidad de falsos positivos en el test de detección de IFN- γ en función de la aptitud del ganado (Gormley *et al.*, 2013b). En cualquier caso, y con el fin de minimizar el efecto del estrés en el resultado de la prueba, en ciertos países como Francia se emplea un criterio de interpretación distinto en el ganado de lidia. En concreto, en un estudio realizado en una región de Francia con una elevada proporción de animales de lidia, la sensibilidad del test de detección de IFN- γ osciló entre 59,9 y 63,1% (empleando el punto de corte estándar y el específico para lidia), mientras que la especificidad varió entre 99,9 y 99,7% (Keck *et al.*, 2012). Además, en un trabajo reciente, se ha puesto de manifiesto el valor del test de detección de IFN- γ como herramienta diagnóstica para lograr disminuir la

prevalencia de tuberculosis en zonas donde predomina el ganado de lidia en Francia (Desvaux *et al.*, 2015).

Sistema de manejo: en España se emplean fundamentalmente dos sistemas de manejo: régimen intensivo y extensivo. El régimen intensivo se caracteriza por una estabulación constante, mientras que en el caso del régimen extensivo los animales permanecen en pasto la mayor parte del tiempo, sometándose a manejo en situaciones concretas (tratamientos, lesiones y/o recuperaciones puntuales, saneamientos, etc.). Existe una tercera posibilidad, denominada régimen semi-extensivo, que se caracteriza por estabulación únicamente por la noche, permitiendo el acceso de pastos durante el día. En cualquier caso, siempre que haya estabulación existe un mayor hacinamiento de los animales, incrementándose el contacto entre ellos y por tanto el riesgo de transmisión (Cosivi *et al.*, 1998). Por otra parte, y debido a que son animales que se ordeñan a diario, están acostumbrados a la presencia y manipulación del hombre y en general la realización de la IDTB en ellos no suele presentar ninguna dificultad.

Como ya se ha comentado, el régimen extensivo los animales solo permanecen estabulados en momentos concretos, estando el resto del tiempo en el pasto con escaso contacto entre ellos, hecho que disminuye el riesgo de infección (Cosivi *et al.*, 1998). De manera esporádica y en función de la producción, a los animales se les complementa la dieta con suplementos alimenticios, práctica que puede conducir a una mayor agregación de los mismos y que puede también incrementar el nivel de estrés (Ameni *et al.*, 2006). Además es necesario tener en cuenta que el manejo en extensivo de los animales es más complicado y en ocasiones se dificulta la localización de la totalidad de los ejemplares, lo que supone un problema en el diagnóstico de la enfermedad. En general, los animales explotados bajo un régimen extensivo son animales que no están acostumbrados a la manipulación por parte del hombre, siendo muy complicada la realización de la IDTB (White & Benhin, 2004), en especial cuando no se cuenta con las instalaciones óptimas. Tradicionalmente se ha descrito una menor transmisión de la enfermedad cuando el ganado está en pasto (Francis, 1947) si bien el manejo extensivo del ganado puede asociarse a otros riesgos como la convivencia con animales de otras explotaciones en pastos comunales (Munyeme *et al.*, 2008, Kaneene *et al.*, 2002), y el contacto con fauna silvestre (Palmer, 2013).

1.4.2. Factores no relacionados con el hospedador

Los factores de riesgo que no se asocian directamente con el hospedador son aquellos que dependen entre otros de la cepa infectiva y de la explotación, y pueden ser determinantes tanto en la progresión de la infección (Skuce *et al.*, 2012) como en el rendimiento de las pruebas diagnósticas.

Cepa: la gran similitud genética del MTBC parecía sugerir que la respuesta inmune inducida tras la infección podría ser similar independientemente de la especie patógena implicada. Sin embargo, se han observado diferencias en la patogenicidad y virulencia observada en distintas especies del MTBC (Medina *et al.*, 2006) e incluso entre distintas cepas de una misma especie (*M. tuberculosis*) en experimentos realizados en ratones y cultivos celulares de macrófagos (Krishnan *et al.*, 2011, Repasy *et al.*, 2015) y en cobayas (Palanisamy *et al.*, 2009). Sin embargo, la hipótesis de la existencia de diferencias en la virulencia asociadas a distintas cepas de *M. bovis* no ha podido ser demostrada de manera concluyente, ya que los trabajos realizados en ese sentido hasta la fecha han arrojado resultados contradictorios (Aguilar *et al.*, 2009, Garbaccio *et al.*, 2014, Waters *et al.*, 2014b, Wright *et al.*, 2013).

En un estudio exploratorio realizado sobre 52 explotaciones bovinas infectadas de manera natural por *M. caprae*, y 125 en las que se había identificado *M. bovis*, no se observaron diferencias significativas en la velocidad de transmisión del patógeno o en el rendimiento de la IDTB y del test de detección de IFN- γ (Álvarez *et al.*, 2012c). Sin embargo, en otro estudio reciente en jabalíes infectados de manera natural por *M. bovis* y *M. caprae* sí se observaron diferencias significativas en el cuadro de lesiones observadas (presencia de bacilos y estadio del granuloma) en los animales en función del agente encontrado, sugiriendo que la infección por *M. caprae* podría conducir a una mayor tasa de excreción (García-Jiménez *et al.*, 2013). Por último, en otro trabajo se comparó la patogenicidad de *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis* en la especie ovina, caprina y porcina, obteniéndose evidencias que sugerían que la especie más susceptible a la infección era la porcina. Sin embargo no fue posible encontrar diferencias significativas en función de las tres especies bacterianas estudiadas (Bezós y colaboradores, resultados no publicados).

Presencia de reservorios de la enfermedad: el concepto de reservorio se aplica a aquellos hospedadores intermediarios en los que el patógeno sobrevive y se replica, logrando permanecer en el ambiente, y a partir de los cuales la enfermedad puede volver a la población diana (por ejemplo el ganado bovino) (Haydon *et al.*, 2002). Los reservorios silvestres de la enfermedad varían en función del país, siendo los más relevantes el tejón (*Meles meles*) en Irlanda y el Reino Unido, la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda, el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en Michigan (Estados Unidos), el jabalí (*Sus scrofa*) en España y el búfalo (*Syncerus caffer*) en Suráfrica (Palmer, 2013). Se ha demostrado que el riesgo de infección en el ganado bovino se incrementa cuando en la cercanía existe alguno de estos reservorios, lo que dificulta la erradicación de la enfermedad (Corner, 2006, Hardstaff *et al.*, 2014).

Para lograr disminuir la prevalencia de la tuberculosis bovina en presencia de reservorios silvestres existen diversas alternativas, una de las más exploradas es el sacrificio de una proporción de los mismos, que ha generado un gran debate. Por ejemplo, en el caso

del tejón como reservorio, algunos autores defienden que esta práctica parece haber contribuido a la disminución de la prevalencia de tuberculosis bovina en países como Irlanda (Good & Duignan, 2011) y Reino Unido (Wilkinson D *et al.*, 2009). Sin embargo un trabajo reciente puso de manifiesto que la incidencia real de tuberculosis en las explotaciones domésticas no se conocía, por lo que no se podía asegurar que el sacrificio aleatorio de una proporción de tejones haya logrado disminuir la prevalencia de la enfermedad (More & McGrath, 2015). Además, se ha descrito que la disminución de la población de tejones en Reino Unido se asoció con una modificación de su patrón de conducta, conduciendo a una mayor movilidad de los mismos, lo que favoreció la transmisión de la tuberculosis a regiones limítrofes donde la prevalencia inicial de la enfermedad era menor (Bielby *et al.*, 2014, Carter *et al.*, 2007). Asimismo la disminución en la población incrementó el contacto entre los ejemplares e incrementó el estrés en los mismos, aumentando su susceptibilidad a la enfermedad (Riordan *et al.*, 2011). En cualquier caso resulta primordial mejorar las medidas de bioseguridad para minimizar el contacto entre la población diana y el reservorio mediante cerramientos periféricos, sistemas que eviten el acceso de las especies reservorio a los comederos o puntos de agua, etc. (Brook *et al.*, 2013, Walter *et al.*, 2012).

Desde un punto de vista estricto, el ser humano también podría considerarse como un potencial reservorio de tuberculosis para el bovino, si bien son limitadas las ocasiones en las que el brote en el ganado se ha producido por *M. tuberculosis* (Waters & Palmer, 2015b). De entre los posibles reservorios domésticos la importancia del ganado caprino ha sido puesta de manifiesto en nuestro país en los últimos años (Napp *et al.*, 2013). Es importante tener en cuenta que cualquier especie susceptible de ser infectada por *M. bovis* o cualquier especie del MTBC podría ser un potencial reservorio de la enfermedad para el ganado bovino.

Estacionalidad de las pruebas diagnósticas: existe escasa información sobre el impacto de este factor en la transmisión y riesgo de la enfermedad. Es necesario tener en cuenta que la estacionalidad está determinada por la época en la que se realizan las pruebas diagnósticas en el ganado, que suele ser en periodos concretos con el fin de facilitar el manejo en la explotación, sobre todo en régimen extensivo (White & Benhin, 2004). La estacionalidad podría tener una influencia crucial en la viabilidad de las micobacterias en el medio, que están relacionadas con un conjunto de factores tales como la carga bacteriana, la materia orgánica presente, el pH, la temperatura, la luz solar, la humedad y la existencia de posibles interacciones con otros microorganismos (Kelly & Collins, 1978, Morris *et al.*, 1994, O'Reilly & Daborn, 1995, Scanlon & Quinn, 2000).

En estudios experimentales se ha descrito que *M. bovis* puede sobrevivir hasta dos años en el subsuelo y en suelos abonados con estiércol (Kelly & Collins, 1978, Morris *et al.*, 1994). Mientras que en el estiércol podría mantenerse viable hasta cinco meses en estaciones frías (Menzies & Neill, 2000), disminuyendo su permanencia en las estaciones calurosas a

pocas semanas (Duffield & Young, 1985). En un estudio realizado en Reino Unido durante nueve años, se demostró que la tuberculosis era estacional y que el riesgo de la enfermedad variaba de un año a otro (Wint *et al.*, 2002), siendo necesario realizar más estudios al respecto para confirmar dicho hallazgo.

Características de la explotación: existen diversos factores dentro de esta categoría que pueden ser decisivos para que se produzcan brotes sucesivos o la explotación permanezca libre de la enfermedad (Skuce *et al.*, 2012). El tamaño de la explotación es un factor muy relevante, ya que se ha descrito que el riesgo de la enfermedad es menor en explotaciones que presentan entre 21 y 53 animales, comparándolo con aquellos que tienen más y/o menos ganado (Wolfe *et al.*, 2009), si bien en general se asume que el riesgo es superior en explotaciones grandes (Bekara *et al.*, 2014, Olea-Popelka *et al.*, 2008). También influye la densidad en la explotación, ya que si un número reducido de animales se mantienen en un espacio amplio el contacto entre ellos es menos frecuente, mientras que si ese mismo número de animales se trasladan a instalaciones más reducidas se incrementa el contacto entre ellos, y por ende la tasa de transmisión de la enfermedad (Keeling & Rohani, 2008). Asimismo, elevadas tasas de hacinamiento suponen mayor estrés para los animales (Ameni *et al.*, 2006), incrementando el riesgo de transmisión de la enfermedad (Griffin *et al.*, 1993b). La gestión del estiércol también puede aumentar el riesgo de transmisión de la enfermedad, ya que en aquellas explotaciones que emplean el estiércol producido por los animales como abono para el pasto se observó una mayor probabilidad de infección que en aquellas que abonaban sus pastos con otros productos (Griffin *et al.*, 1993b). La procedencia de los animales de reemplazo en la explotación es otro factor decisivo, sobre todo cuando el movimiento de animales es de zonas de elevada prevalencia hacia zonas de baja prevalencia (Carrique-Mas *et al.*, 2008). Entre el 0,8 y el 6,9% de los brotes producidos en 1989, durante 1996 y 1997 y en el año 2003 en Irlanda, pudieron atribuirse a la compra de animales procedentes de explotaciones en los que se detectó la infección con posterioridad (Griffin, 1993a, O'Keeffe & O'Driscoll, 1996, Wolfe *et al.*, 2009). En algunas explotaciones sin embargo el reemplazo de animales se realiza con un porcentaje de las crías nacidas en el rebaño, lo que si bien disminuye el riesgo de introducción de animales infectados puede suponer un problema en el caso de proceder de madres infectadas, aunque respecto a la descendencia de madres infectadas hay cierta controversia. Se ha sugerido que son animales más propensos a la infección, pero un estudio reciente puso de manifiesto que no había diferencias entre madres infectadas y sanas en el riesgo de infección por *M. bovis* identificado en su descendencia (Menzies *et al.*, 2012). También es importante tener en cuenta la situación epidemiológica de las explotaciones colindantes, ya que la proximidad de rebaños infectados se ha considerado como un factor de riesgo de la enfermedad (Denny & Wilesmith, 1999, Kaneene *et al.*, 2002, Munroe *et al.*, 1990). Por último, la permanencia de los animales en la explotación es otro

parámetro estrechamente ligado con la aptitud de los animales a tener en cuenta en relación con el riesgo de enfermedad. En general la vida productiva del ganado de leche es inferior a la del ganado de carne, por lo que normalmente estos animales se mantienen durante menos tiempo en la explotación y disminuye el riesgo que representan en caso de estar infectados y no haber sido detectados (Humblet *et al.*, 2009). Al tener el ganado de carne y de lidia una vida productiva más longeva se favorece también la aparición de fenómenos de anergia que dificultan el diagnóstico de la tuberculosis, principalmente cuando se emplean pruebas de base celular (Lepper *et al.*, 1977b).

Alimentación: algunos estudios han descrito una cierta asociación entre la aparición de brotes recurrentes de tuberculosis en ganado bovino y la calidad del pasto y/o el uso de suplementación mineral, lo que sugiere una relación directa entre una nutrición deficiente y una mayor susceptibilidad a la enfermedad (Griffin, 1993a). Las carencias nutricionales pueden provocar la disminución de determinadas subpoblaciones de linfocitos y modificar por tanto los procesos inmunológicos en los que participan. Como consecuencia, los animales podrían ser más susceptibles a la enfermedad y el rendimiento de las pruebas diagnósticas podría verse alterado.

La interferencia diagnóstica debido a malnutrición se ha descrito en conejos y cobayas (Bell *et al.*, 1986, McMurray *et al.*, 1989), aunque no ha podido ser demostrada en bovino infectado de manera experimental (Doherty *et al.*, 1996b). En un estudio realizado en Irlanda, no se observó ninguna asociación entre la limitación de la dieta y la transmisión de la enfermedad en ganado bovino (Costello *et al.*, 1998). Sin embargo en el vacuno, se ha comprobado que niveles bajos de algunas vitaminas y minerales (cobre, selenio, vitamina B12) favorecen que el animal sea más susceptible a la infección (Downs *et al.*, 2008). La alimentación de los animales criados en intensivo es por norma general más homogénea y completa, mientras que aquellos mantenidos en extensivo dependen de la producción natural del medio y ésta es más variable, por lo que podrían ser más susceptibles a la infección (Francis, 1947).

La actividad antibacteriana de la vitamina D ha sido descrita como un potencial mecanismo protector frente a la tuberculosis (Cassidy & Martineau, 2014, Facchini *et al.*, 2015, Hewison, 2011, Nelson *et al.*, 2012), ya que su actividad principal es aumentar la producción de óxido nítrico, un potente agente antimicrobiano (Fabri *et al.*, 2011, Waters *et al.*, 2001), y recientemente se ha observado una correlación entre los niveles de IL-32 y vitamina D (conversión de 25D a 1,25D) que facilita la actividad antimicrobiana de varios péptidos determinantes en el control de la infección (Montoya *et al.*, 2014). El efecto protector de la vitamina D se ha descrito en cobayas (Murray *et al.*, 1990) y en ganado bovino infectado de manera experimental (Rhodes *et al.*, 2003). En un estudio reciente realizado en España en jabalí y ciervo infectados de forma natural, se observaron niveles elevados de vitamina D3 en

aquellos animales que presentaban lesiones tuberculosas localizadas comparados con aquellos con cuadros generalizados (Risco y colaboradores, artículo en revisión). Actualmente se están realizando estudios en ganado bovino, caprino y fauna silvestre infectados de forma natural en los que se suplementa la dieta con diversas cantidades y formulaciones de vitamina D para evaluar posteriormente las posibles diferencias en la transmisión y el desarrollo de la enfermedad. Los resultados preliminares sugieren que además de favorecer la acción microbiana, la vitamina D participa en la formación del granuloma tuberculoso [conforme a lo descrito anteriormente (Rhodes *et al.*, 2003)], ya que en animales que consumieron el pienso suplementado las lesiones tuberculosas eran más circunscritas y presentaban mayor grado de calcificación que aquellos que no lo hicieron, lo que limitaría la excreción bacteriana (de Juan y colaboradores, resultados no publicados).

Modificación intencionada del resultado de las pruebas diagnósticas: estas prácticas se realizan esporádicamente con fines fraudulentos para producir falsos resultados positivos/negativos. A pesar de que se consideran actuaciones poco frecuentes, pueden tener gran trascendencia en el proceso de erradicación de la enfermedad y suponer considerables pérdidas económicas.

Se ha descrito que la inoculación intradérmica de una sustancia compuesta por tuberculina y líquido extraído de pápulas tuberculosas produce respuestas positivas en animales sanos (Kerr *et al.*, 1946b) y que en terneros la administración del calostro de hembras positivas también produce una sensibilización pasiva a las pruebas diagnósticas durante las 4-6 semanas posteriores a la ingesta (Lamont, 1947). Un resultado positivo también puede lograrse mediante la inoculación de sustancias abrasivas en el punto de inoculación del antígeno, lo que conduce a reacciones inflamatorias locales que pueden confundirse con un resultado positivo en la IDTB (*The Control of Bovine Tuberculosis in Northern Ireland*, 2009). La administración sistémica de corticosteroides, por otro lado, puede provocar una negativización de los resultados tanto en la IDTB (Doherty *et al.*, 1995b), como en el test de detección de IFN- γ (Doherty *et al.*, 1995b, Goff, 1996).

Otra manera indirecta de modificar el resultado de las pruebas es alterar la trazabilidad y la identificación de los animales (fechas de nacimiento incorrectas, movimientos no autorizados, intercambio de los números identificativos, etc.). Para tratar de eliminar estas irregularidades, en algunos países como en Reino Unido, se sugirió recoger muestras de material genético de los animales que sean positivos a la IDTB el día de la lectura para identificarlos en el momento (Locke & Fishwick, 2011).

El test de detección de IFN- γ es una prueba en la que es más difícil alterar los resultados, aunque se ha descrito que en animales infectados con *M. bovis* la DO obtenida tras la estimulación con la PPD bovina fue significativamente inferior cuando se empleó una

aflatoxina a 0,5 µg/ml conjuntamente con la PPD para realizar la estimulación de las muestras (Paul *et al.*, 1977).

Infección y/o co-infección por otros agentes: en general, cualquier proceso patológico concomitante en el hospedador modifica y puede llegar a comprometer la eficacia de su respuesta inmune, predisponiendo al animal a la infección y pudiendo originar fenómenos de interferencia en las pruebas diagnósticas (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b). Normalmente la co-infección con otros patógenos produce una negativización de la respuesta, como se ha descrito en infecciones concomitantes con el virus de BVD en el test de detección de IFN-γ (Charleston *et al.*, 2001). Se ha descrito un posible efecto inmunosupresor derivado de la infección por *Fasciola hepatica*, que podría comprometer la sensibilidad de la IDTB (Claridge *et al.*, 2012, Flynn *et al.*, 2007, Jones, 2012).

También se ha especulado con un efecto causado por la infección con miembros de géneros que presentan similitud antigénica con el género *Mycobacterium* (principalmente *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*) sobre la especificidad de las pruebas diagnósticas. En pequeños rumiantes se han descrito casos de interferencia diagnóstica producidos principalmente por *C. pseudotuberculosis* frente a las pruebas de detección de tuberculosis (Brown & Olander, 1987, Manning *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio publicado recientemente en cabras sensibilizadas de manera experimental con *C. pseudotuberculosis* no se observó interferencia diagnóstica en la IDTB ni en el test de detección de IFN-γ en (Bezoz *et al.*, 2015).

Dentro del género *Mycobacterium* existen más de 125 especies no incluidas en el MTBC, de las que una gran proporción son bacterias muy ubicuas y que potencialmente pueden producir fallos diagnósticos debido a su similitud antigénica con los miembros del MTBC (Cooney *et al.*, 1997). Los fenómenos de interferencia diagnóstica han sido ampliamente estudiados cuando la co-infección se produce con micobacterias del MAC (principalmente *M. avium* subsp. *paratuberculosis*), habiéndose notificado casos de co-infección de forma natural en bovino (Aagaard *et al.*, 2010, Álvarez *et al.*, 2009, Aranaz *et al.*, 2006, Dunn *et al.*, 2005), ovino (Jorge *et al.*, 2000) y caprino (Álvarez *et al.*, 2008). El grado de interferencia en las pruebas diagnósticas de tuberculosis puede variar en función de la edad del hospedador (Mitchell *et al.*, 2012, Nielsen & Ersbøll, 2006). La sensibilización con *M. avium* previa a la infección experimental con *M. bovis* podría incluso conferir al hospedador cierta protección frente al desarrollo de la enfermedad, ya que estimula el sistema inmune (Hope *et al.*, 2005b).

La interferencia diagnóstica provoca la aparición en la IDTB y en el test de detección de IFN-γ de falsos negativos (Álvarez *et al.*, 2009) y falsos positivos (Barry *et al.*, 2011). Es por tanto esencial que en situaciones en las que se sospeche de la ocurrencia de co-infección se empleen las pruebas diagnósticas y el criterio adecuados (Faye *et al.*, 2011).

Material: es imprescindible que el material empleado en la realización de las pruebas diagnósticas sea calibrado, revisado y desinfectado periódicamente para evitar fallos en las mismas relacionado con un mantenimiento incorrecto del equipo. En dos estudios en los que se preguntaba a los veterinarios que realizan la IDTB en campo acerca de los diversos factores que podrían afectar al resultado de la prueba, se puso de manifiesto que la revisión del equipamiento empleado no siempre se realiza de manera adecuada (Humblet *et al.*, 2011a, Humblet *et al.*, 2011b).

En relación a la IDTB, es necesario que los equipos que se emplean garanticen la inoculación del volumen estipulado (máximo de 0,2 ml por cada IDTB) (Duignan *et al.*, 2012) y se sigan las instrucciones del fabricante en cuanto a su calibración. En el ganado caprino el material que se emplea para la realización de la IDTB es el mismo que para el bovino, a pesar de que en alguna ocasión se ha sugerido que la piel de la cabra podría ser más laxa que la de la vaca, por lo que al usar el material diseñado para el bovino la inoculación del antígeno podría realizarse en la zona subcutánea; sin embargo hasta la fecha no hay datos que confirmen esta teoría. Para valorar este posible efecto en otra especie animal, en alpacas infectadas de forma natural se realizó la IDTB empleando simultáneamente agujas hipodérmicas y el sistema de inyección Dermojet, obteniéndose los mismos resultados con ambos sistemas (Bezoz y colaboradores, resultados no publicados).

En otro estudio se comprobó que el volumen de inoculación era un factor esencial cuando para la realización de la IDTB se emplean sistemas de inyección que permiten la inoculación de las PPDs en repetidas ocasiones, ya que la precisión de los equipos puede verse modificada (Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica, 2011).

Antígeno: es esencial que el antígeno que se emplea para la realización de las pruebas de base celular esté en perfectas condiciones (conservación, requisitos de producción, fecha de caducidad, etc.). Ya en 1959 se sugirió que sería necesario emplear PPDs que garantizaran una potencia biológica mínima con el fin de detectar el mayor número de animales infectados (Ritchie, 1959). Se ha comprobado como las PPDs que presentan mayor potencia biológica incrementan la sensibilidad de la IDTB (Good *et al.*, 2011a, Good *et al.*, 2011b). También se ha descrito que la potencia biológica afecta al test de detección de IFN- γ (Schiller *et al.*, 2010c). Sin embargo es necesario considerar que el empleo de PPDs con elevada potencia biológica en ausencia de enfermedad podría disminuir la especificidad de la prueba, hipótesis sobre la cual hay escasa información.

Como el componente principal de las PPDs son proteínas (Seibert & Glen, 1941) es necesario garantizar y mantener determinadas condiciones de conservación que eviten su desnaturalización (temperatura, exposición a la luz, esterilidad, etc.). No obstante, las evidencias acerca del posible efecto de fallos en la conservación de las PPDs sobre la prueba

son en ocasiones contradictorias; en un estudio realizado para valorar el efecto de posibles contaminaciones en el antígeno no se observaron diferencias en pacientes al realizar la IDTB al emplear un vial recién abierto comparado con otros abiertos desde hacía una semana y un mes respectivamente (Fernández-Villar *et al.*, 2004). Otro estudio preliminar demostró que no había diferencia en la IDTB realizada con una PPD mantenida a una temperatura adecuada y otra sometida a variaciones de temperatura en ganado bovino infectado de forma natural (Díez-Guerrier y colaboradores, resultados no publicados). Al estudiar si la temperatura podía afectar a la potencia biológica de las PPDs, únicamente se observó variación en la misma al mantenerla a 100°C durante varios días (Maes *et al.*, 2011). Estos resultados sugirieron que la PPD es un producto muy estable incluso cuando no se mantiene en condiciones óptimas.

El efecto de la conservación de las PPDs sobre el test de detección de IFN- γ ha sido objeto de mucha menos atención. Se ha evaluado el efecto que sobre la capacidad estimulante de las PPDs *in vitro* tenía el uso de un desinfectante, no observándose ninguna alteración (Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica, 2011).

Factor humano: la IDTB tiene una gran carga subjetiva, determinante en la interpretación de la misma. Para minimizar este aspecto es esencial que la medición del grosor de la piel antes y después de la inoculación se realice por el mismo veterinario. Asimismo con el fin de mejorar la formación y unificar criterios de interpretación, el grupo de trabajo de tuberculosis bovina de la *Task Force*, determinó que a nivel nacional es necesario que los veterinarios que realizan las campañas de erradicación se acrediten en la realización de la IDTB (*Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force*, 2013).

Para evaluar este factor, Humblet y colaboradores realizaron una encuesta anónima a los veterinarios que realizan la IDTB en distintas regiones de Bélgica en la que se incluían los posibles factores que podían intervenir en la prueba. El resultado de la encuesta puso de manifiesto que la situación práctica en el campo distaba mucho de las recomendaciones teóricas recogidas sobre la realización de la misma (Humblet *et al.*, 2011a, Humblet *et al.*, 2011b). Meses después se hizo la misma encuesta a los veterinarios que realizan la IDTB en distintas regiones de Francia antes y después de que tuviera lugar un congreso sobre la realización de la prueba. Los resultados obtenidos en la encuesta fueron significativamente superiores tras la celebración del congreso, poniendo de manifiesto que la técnica IDTB requiere de formación previa, y reciclaje continuo de los veterinarios implicados para su correcta realización. En un estudio en ganado bovino infectado de forma natural (48 animales) con el objetivo de medir el impacto del operario en el rendimiento de la prueba se obtuvo una discordancia del 21% en razas de manejo tranquilo y hasta un 70% en razas de manejo más delicado entre tres operarios (Casal y colaboradores, resultados no publicados).

En los últimos años se han evaluado métodos para estandarizar la interpretación de la IDTB en cobayas y humanos, tales como el láser Doppler (Harrison *et al.*, 1993), el espectrofotómetro (Chambers *et al.*, 2002) y la ultrasonografía (Ciftci *et al.*, 2005). En animales, se han realizado pruebas empleando la termografía digital (Merkal *et al.*, 1977), que además de estandarizar la lectura de la IDTB, permitiría realizar la interpretación de la misma sin tener que encerrar a los animales 72 horas tras la inoculación del antígeno, suponiendo una gran ventaja en ganado de manejo complicado. El test de detección de IFN- γ es una prueba más estándar en lo que a interpretación se refiere, no siendo necesario realizar hasta la fecha ninguna acreditación para su realización.

Vacunación: las pruebas diagnósticas no ofrecen una buena discriminación entre animales infectados de forma natural y aquellos vacunados frente a otras enfermedades causadas por micobacterias, utilizando la vacuna *M. bovis* BCG (Buddle *et al.*, 2013a, Conlan *et al.*, 2015) y vacunas frente a paratuberculosis (Bezoz *et al.*, 2012c, Coad *et al.*, 2013, Garrido *et al.*, 2013). Actualmente las dos vacunaciones están prohibidas en ganado bovino (Directiva Europea 78/52/CEE), si bien a nivel nacional en el caprino sí se puede realizar la vacunación frente a paratuberculosis utilizando una vacuna inactivada en animales menores de seis meses. Los aspectos relativos en relación a la vacunación de tuberculosis se han comentado anteriormente en el apartado de respuesta inmune frente a la tuberculosis.

En relación al efecto de la vacuna frente a paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado bovino hay una gran variedad de resultados obtenidos, debido que existen múltiples vacunas comerciales disponibles. En un estudio en el que se empleó una vacuna viva en cuatro animales de 28 días y se hizo un seguimiento durante los dos años posteriores con pruebas de base celular (IDTB y test de detección de IFN- γ) y humoral, se observó que el nivel de sensibilización en la IDTB y en el test de detección de IFN- γ fue muy elevado y de duración prolongada. Sin embargo, la respuesta observada en el ELISA para la detección de Ac fue mucho más variable, detectándose resultados positivos desde las 8-16 semanas post-vacunación que se negativizaron 48-60 semanas tras la vacunación (Kohler *et al.*, 2001).

Otros trabajos se han centrado en la evaluación del efecto de varias vacunas inactivadas de distintas casas comerciales obtenidas mediante distintos procesos. Cuando se empleó una vacuna inactivada CZ Veterinaria, en 42 animales de 12 semanas de edad y se valoró la interferencia con pruebas de base celular (IDTB y test de detección de IFN- γ realizado con antígenos específicos) y humoral. Observándose una mayor interferencia diagnóstica en las pruebas serológicas que con las pruebas de base celular (Coad *et al.*, 2013). En otro estudio reciente realizado en España desde 2005 hasta 2011, se vacunaron más de 2.000 animales de distintas edades con una vacuna inactivada frente a paratuberculosis, y se realizó la IDTB simple y comparada cuando los animales alcanzaban

las seis semanas de edad. La proporción de animales reactivos fue superior empleando la prueba simple (0,8-20,4%) en relación a la comparada (0,3-0,6%), sin que se detectara ninguna diferencia en función de la edad en la que se vacunó a los animales (Garrido *et al.*, 2013).

En otro trabajo se vacunaron más de 200 animales menores de 30 días con otra vacuna inactivada completa frente a paratuberculosis (ID-Lelystad, Lelystad). Se hizo un seguimiento durante los 12-14 años posteriores a la vacunación con el test de detección de IFN- γ y pruebas de base humoral, y los resultados pusieron de manifiesto una interferencia diagnóstica prolongada en todas las pruebas realizadas y una gran variabilidad individual de respuestas durante todo el estudio (Muskens *et al.*, 2002).

En otro estudio experimental se valoró la interferencia diagnóstica causada por otra vacuna inactivada (Mycopar, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA) en 5 animales de 7 días de edad durante 12 meses empleando la IDTB comparada (interpretación estándar), el test de detección de IFN- γ (estimulando las muestras con las PPDs tradicionales y antígenos específicos del MTBC) y pruebas de base humoral. La aparición de resultados positivos fue más precoz en las pruebas de base celular que en la detección de Ac; asimismo la proporción de resultados positivos obtenidos en el test de detección de IFN- γ fue significativamente inferior empleando los antígenos específicos que las PPDs tradicionales. En este trabajo la interferencia obtenida en la IDTB y las pruebas serológicas fue mínima (Stabel *et al.*, 2011). En otro estudio realizado con la misma vacuna inactivada desde 2006 hasta 2011 se vacunaron más de 500 animales menores a 35 días de edad y se realizaron muestreos para la detección de Ac frente a tuberculosis en suero y leche; no se observaron interferencias diagnósticas en los resultados obtenidos (Tewari *et al.*, 2014).

Para valorar la interferencia causada por las vacunas frente a paratuberculosis en las pruebas diagnósticas de tuberculosis también se han evaluado otras vacunas alternativas que no contienen la micobacteria completa. En un estudio en el que se seleccionaron 30 animales vacunados a los dos años con la vacuna completa inactivada y otra vacuna de subunidades se empleó la IDTB comparada (interpretación estándar) y el test de detección de IFN- γ durante nueve meses. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la proporción de animales falsos positivos fue significativamente inferior con la vacuna de subunidades que con la vacuna completa (Santema W *et al.*, 2011). Otra candidata que actualmente está en fase experimental, una vacuna obtenida mediante recombinación con un adenovirus, se incluyó en un estudio realizado durante siete meses en el que se vacunaron animales de ocho semanas empleando distintas vías y combinaciones. La interferencia se evaluó con la IDTB comparada (interpretación estándar) y el test de detección de IFN- γ (estimulando las muestras con las PPDs tradicionales y antígenos específicos del MTBC). La proporción de resultados positivos obtenidos en el test de detección de IFN- γ fue significativamente inferior empleando los

antígenos específicos que las PPDs tradicionales, sin que se detectara ningún animal reactor a la IDTB (Bull *et al.*, 2014).

En ganado caprino se empleó la vacuna inactivada de CZ Veterinaria en 70 animales menores de un mes. El objetivo de ese estudio fue valorar la interferencia diagnóstica de las pruebas de base celular con animales de distintas edades que oscilaban entre 8 y 20 meses y más de tres años. La IDTB simple fue menos específica en aquellos animales entre 8 y 20 meses de edad mientras que la especificidad obtenida por la IDTB comparada fue del 100% en animales de 20 meses o mayores. Los resultados obtenidos con el test de detección de IFN- γ mostraron que la especificidad fue menor en los animales de 3 años (Chartier *et al.*, 2012). En otro estudio realizado en España en el que se empleó la misma vacuna inactivada en 100 animales de ganado caprino menores de seis meses, se comprobó que la especificidad de la IDTB (tanto simple como comparada) y del test de detección de IFN- γ fue significativamente inferior en rebaños libres de tuberculosis que vacunaban frente paratuberculosis en comparación con rebaños en los que no se vacunó (Bezós *et al.*, 2012c).

2. OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS / OBJECTIVES AND ORGANISATION OF THE THESIS

La tuberculosis está considerada como una de las principales enfermedades infecciosas a nivel mundial debido al gran número de muertes que produce y al coste económico que supone su tratamiento en el ser humano, las campañas de erradicación en el ganado y el descenso en la productividad de los animales infectados (Enfermedades de la Lista de la OIE, 2015). Las pruebas existentes para su diagnóstico en animales presentan ciertas limitaciones, y por este motivo un mejor conocimiento del funcionamiento de las mismas (tanto las oficiales como las que se encuentran en fase experimental) puede ayudar a desarrollar estrategias para incrementar su rendimiento. Asimismo, es de suma importancia profundizar en el estudio de los mecanismos que causan interferencias con las pruebas diagnósticas actualmente en uso, para así maximizar la detección de animales infectados minimizando el sacrificio innecesario de animales.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, los objetivos generales de la presente tesis doctoral son los siguientes:

- (1) Optimización de las pruebas de base celular actualmente en uso (IDTB y test de detección de IFN- γ) para el diagnóstico de la tuberculosis en rumiantes (ganado bovino y caprino).
- (2) Evaluación de una nueva vacuna frente a la tuberculosis humana (*M. tuberculosis* SO2) en ganado caprino.
- (3) Evaluación de la reactividad a las pruebas diagnósticas y de las lesiones desarrolladas en ganado caprino infectado experimentalmente con distintas especies del MTBC.
- (4) Análisis del rendimiento de las pruebas diagnósticas de tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas).

La presente tesis doctoral se ha estructurado en cuatro capítulos para lograr alcanzar los objetivos generales. En cada capítulo se encuadran distintos objetivos específicos, cada uno de los cuales ha servido para la realización de un estudio experimental.

Capítulo I. Optimización de las pruebas de base celular actualmente en uso (IDTB y test de detección de IFN- γ) para el diagnóstico de la tuberculosis en rumiantes (ganado bovino y caprino). El capítulo I engloba tres objetivos específicos que han servido para la realización de tres estudios experimentales.

Primer estudio experimental: valoración del efecto de la posición en el resultado de la IDTB en ganado bovino libre e infectado de forma natural.

Segundo estudio experimental: determinación del efecto del criterio de interpretación establecido en el test de detección de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino procedentes de explotaciones libres e infectadas de forma natural.

Tercer estudio experimental: análisis del efecto del kit comercial en el resultado del test de detección de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino procedente de explotaciones infectadas de forma natural.

Capítulo II. Evaluación de una nueva vacuna frente a la tuberculosis humana (*M. tuberculosis* SO2) en ganado caprino. El capítulo II engloba un objetivo específico que ha servido para la realización de un estudio experimental.

Cuarto estudio experimental: evaluación de la interferencia producida con la vacuna *M. tuberculosis* SO2 en el diagnóstico de tuberculosis en ganado caprino.

Capítulo III. Evaluación de la reactividad a las pruebas diagnósticas y de las lesiones desarrolladas en ganado caprino infectado experimentalmente con distintas especies del MTBC. El capítulo III engloba un objetivo específico que ha servido para la realización de un estudio experimental.

Quinto estudio experimental: valoración de la respuesta a la IDTB, al test de detección de IFN- γ y del cuadro de lesiones desarrollado en ganado caprino infectado de forma experimental con tres especies del MTBC.

Capítulo IV. Análisis del rendimiento de las pruebas diagnósticas de tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas). El capítulo IV engloba dos objetivos específicos que han servido para la realización de dos estudios experimentales.

Sexto estudio experimental: evaluación de la sensibilidad de la IDTB con distintos protocolos y de un ELISA experimental en alpacas infectadas de forma natural.

Séptimo estudio experimental: evaluación de la especificidad de la IDTB con distintos protocolos y de un ELISA experimental en llamas y alpacas libres de tuberculosis en su hábitat natural.

Todo el manejo y la manipulación realizados a los animales incluidos en los distintos estudios de la presente tesis doctoral se llevó a cabo cumpliendo con la normativa nacional (Real Decreto 348/2000) y europea (Directiva Europea 98/458/CE). Todos los procedimientos desarrollados en los animales incluidos en la presente tesis doctoral con fines experimentales se realizaron por personal veterinario especializado conforme a la normativa nacional (Real Decreto 1201/2005). Las explotaciones de ganado bovino incluidas en la presente tesis doctoral por su calificación OTF se seleccionaron de acuerdo con la normativa nacional (Real Decreto 1716/2000) y europea (Directiva Europea 64/432/CEE).

OBJECTIVES AND ORGANISATION OF THE THESIS

Tuberculosis is considered a major infectious disease worldwide due to the high mortality rate in humans, the economic cost involved in the treatment of human cases, the costs of the eradication campaigns in livestock, and the decline in the productivity of infected animals (OIE-Listed diseases 2015). Diagnostic tests currently available for the detection of the infection in animals have certain limitations. For this reason a better understanding of their characteristics (both of the official and those that are in an experimental phase), may help develop strategies that enhance their performance. To this direction, it is of utmost importance to increase the knowledge on the factors that cause interference with the diagnostic tests currently in use in order to maximize the detection of infected animals and minimize unnecessary slaughtering.

According to the above, the objectives of this thesis are:

- (1) Optimization of the diagnostic techniques based on the cell mediated immune response [single intradermal tuberculin (SIT) test and the interferon-gamma (IFN- γ) assay] for the diagnosis of tuberculosis in ruminants (cattle and goats).
- (2) Evaluation of a new vaccine against human tuberculosis (*M. tuberculosis* SO2) in goats.
- (3) Evaluation of the response to diagnostic tests and assessment of the lesions developed in goats experimentally infected with different species of the MTBC.
- (4) Assessment of the performance of diagnostics tests for the detection of tuberculosis in South American camelids (llamas and alpacas).

This thesis is structured in four chapters that cover the four objectives detailed above. In each chapter, different specific objectives were defined, each of which has served for the realization of an experimental study.

Chapter I. Optimization of the diagnostic techniques based on the cell mediated immune response [single intradermal tuberculin (SIT) test and the interferon-gamma (IFN- γ) assay] for the diagnosis of tuberculosis in ruminants (cattle and goats). Chapter I includes three specific objectives that served for performing three experimental studies.

First experimental study: evaluation of the position effect in the result of the SIT test in OTF and naturally infected cattle.

Second experimental study: determination of the interpretation criteria effect established in the IFN- γ assay over samples collected from OTF and naturally infected cattle.

Third experimental study: analysis of the effect of the commercial kit on the result of the IFN- γ assay over samples collected from naturally infected cattle.

Chapter II. Evaluation of a new vaccine against human tuberculosis (*M. tuberculosis* SO2) in goats. Chapter II includes a specific objective that has served for the realization of an experimental study.

Fourth experimental study: evaluation of the interference produced after vaccination with the *M. tuberculosis* SO2 vaccine in the diagnosis of tuberculosis in goats.

Chapter III. Evaluation of the response to diagnostic tests and assessment of the lesions developed in goats experimentally infected with different species of the MTBC. Chapter III includes a specific objective that has served for the realization of an experimental study.

Fifth experimental study: valuation of the response to the SIT test and the IFN- γ assay and the clinical picture developed in goats experimentally infected with three species of the MTBC.

Chapter IV. Assessment of the performance of diagnostics tests for the detection of tuberculosis in South American camelids (llamas and alpacas). Chapter IV comprises two specific objectives that have served for performing two experimental studies.

Sixth experimental study: evaluation of the sensitivity of the SIT test performed under different protocols and an ELISA in TB naturally infected alpacas.

Seventh experimental study: evaluation of the specificity of the SIT test performed under different protocols and an ELISA in TB-free alpacas and llamas under their natural habitat.

Handling of animals, testing and sampling was conducted according with national (R.D.348/2000) and European (European directive 98/458/CE) regulations. All procedures performed on animals for the experimental purposes of this thesis were conducted by accredited veterinarians in compliance with national regulations (R.D.1201/2005). OTF farms included in this thesis were characterized in accordance with national (R.D.1716/2000) and European (European directive 64/432/CEE) regulations.

3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En la presente tesis doctoral se incluyen un total de siete estudios experimentales desarrollados para cumplir los objetivos específicos propuestos. Los distintos estudios se encuadran dentro de los cuatro capítulos en los que se ha estructurado esta tesis.

3.1. CAPÍTULO I. OPTIMIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE BASE CELULAR ACTUALMENTE EN USO (IDTB Y TEST DE DETECCIÓN DE IFN- γ) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EN RUMIANTES (GANADO BOVINO Y CAPRINO)

La tuberculosis bovina es una enfermedad de declaración obligatoria y que está sujeta a campañas de erradicación que se basan en una estrategia de “diagnóstico y sacrificio” (de los animales positivos), gracias a la cual se ha logrado disminuir la prevalencia y erradicar la enfermedad en distintas regiones. Sin embargo, a pesar de las campañas en determinadas zonas la prevalencia de la enfermedad no ha seguido esta evolución favorable, debido en parte a las limitaciones que presentan las pruebas diagnósticas actualmente en uso. Las pruebas incluidas en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina y en el ganado caprino (también sometido a programas de erradicación en algunas regiones) son la IDTB (simple o comparada) y el test de detección de IFN- γ . Ambas son pruebas que detectan en el hospedador la respuesta mediada por células, principal respuesta inmune implicada en la contención del patógeno en las fases iniciales de la infección. El empleo de estas pruebas diagnósticas permite por tanto detectar animales infectados en los estadios más tempranos de enfermedad con el fin de eliminarlos de la explotación cuando la infección se encuentra en las fases iniciales (previo a la excreción). Como se ha comentado, existen multitud de factores que pueden interferir en las pruebas de base celular; algunos han sido ampliamente estudiados mientras que sobre otros no existe demasiada información. Su identificación, permitiría la introducción de medidas correctoras y la optimización del rendimiento de las pruebas diagnósticas que se emplean en la actualidad para la tuberculosis bovina y en otras especies animales.

El capítulo I engloba tres objetivos específicos centrados en esta hipótesis, cada uno de los cuales ha servido para la realización del primer, segundo y tercer estudio experimental de la presente tesis doctoral.

3.1.1. Primer estudio experimental: efecto de la posición en el resultado de la IDTB en ganado bovino libre e infectado de forma natural

El primer estudio experimental se diseñó para valorar el efecto de la posición en la respuesta obtenida en la IDTB en ganado bovino libre e infectado de forma natural. La finalidad del estudio fue actualizar el conocimiento existente sobre la variabilidad registrada en los resultados de la IDTB en función del punto de inoculación de la PPD bovina, dado que la mayor parte de estudios realizados con este objetivo datan de hace más de 40 años y se realizaron bajo condiciones distintas a las del presente trabajo. El estudio se realizó en animales procedentes de rebaños calificados OTF y también en animales infectados de forma natural, con el fin de poder valorar el efecto de la localización (comparando las zonas cervical anterior, posterior pre-escapular y escapular) en la especificidad y la sensibilidad de la prueba, respectivamente. Por otra parte, sobre los animales infectados se evaluó incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas. **Este primer estudio experimental se enmarca dentro del capítulo I.**

3.1.1.1. Material y métodos

3.1.1.1.1. Población en estudio

Para valorar el efecto de la posición en la realización de la IDTB, se seleccionaron 1.066 animales, 248 procedentes de cuatro explotaciones calificadas OTF y 818 procedentes de cinco explotaciones positivas (en las que se había confirmado la infección en el saneamiento previo), situadas en distintas regiones de España. Posteriormente, los animales sacrificados tras la realización de las pruebas en los que se confirmó la infección mediante técnicas post-mortem (cultivo microbiológico positivo y/o presencia de lesiones compatibles con la enfermedad, n=209) fueron seleccionados para evaluar un posible incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas. En la Tabla 2 se detalla la información de cada una de las explotaciones seleccionadas, el momento de realización del muestreo y los animales sacrificados en los que se confirmó la infección (presencia de lesiones y/o cultivo microbiológico positivo). El sistema de manejo de la mayor parte de los rebaños incluidos en el estudio era extensivo [con los animales en pasto la mayor parte del tiempo, siendo sometidos a manejo solo en situaciones concretas (tratamientos, lesiones y/o recuperaciones puntuales, saneamientos, etc.)]. Únicamente tres explotaciones (explotación calificada OTF 4, y explotaciones infectadas 2 y 5a) estaban sometidas a un manejo intensivo, con los animales estabulados en áreas de mayor densidad. La explotación 5 se dividió en 5a y 5b porque eran subpoblaciones mantenidas en localizaciones diferenciadas sin ningún tipo de contacto entre ellas: la población 5a (terneros en cebo) estaba constituida por animales menores de 1 año, mantenidos en corrales con agua

y comida *ad libitum*, mientras que la población 5b (rebaño de reproductoras) consistía principalmente en hembras adultas (con una edad superior a 2 años) mantenidas en extensivo. De acuerdo a la legislación nacional y Europea, todos los animales incluidos en el estudio eran mayores de 6 semanas, y se respetó un periodo mínimo de 42 días entre la última prueba IDTB y el análisis realizado para el estudio.

Tabla 2. Características de las explotaciones calificadas OTF e infectadas de forma natural incluidas en el primer estudio experimental.

includida en el primer estudio experimental.

| | Explotaciones calificadas OTF | | | |
|---------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Animales (n) | 167 | 13 | 30 | 38 |
| Aptitud | Cárnica | Cárnica | Cárnica | Láctea |
| Manejo | Extensivo | Extensivo | Extensivo | Intensivo |
| Saneamiento previo | 6 meses | 6 meses | 6 meses | 6 meses |
| % reactores ¹ | 0% | 0% | 0% | 0% |
| OTF ² | 2008 | 2008 | 2008 | 2011 |
| Localización ³ | Centro | Centro | Centro | Centro |
| Fecha | Nov. | Nov. | Nov. | Nov. |

| | Explotaciones infectadas de forma natural | | | | | |
|--------------------|-------------------------------------------|---------------|---------------|--------------------------|---------------|-----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5a | 5b |
| Animales (n) | 138 | 43 | 92 | 347 | 43 | 155 |
| Aptitud | Cárnica | Láctea | Cárnica | Lidia | Cárnica | Cárnica |
| Manejo | Extensivo | Intensivo | Extensivo | Extensivo | Cebadero | Extensivo |
| Saneamiento previo | 5 meses | 2 | 2 | >6 meses | 6 | 6 |
| % reactores | 13/164 7,9% | 7/68 10,3% | 6/104 5,8% | 7/328 2,1% | 5/43 11,6% | 90/147 61,2% |
| OTF ⁵ | >1 año | >1 año | >6 meses | >1 año | >1 año | >1 año |
| Localización | Centro | Norte | Centro | Sur | Centro | |
| Fecha | Oct. | Jul. | Sept. | Ene-Abr-May ⁶ | Jun. | Jul. |
| Sacrificio | 46 | 43 | 92 | 51 | 43 | 155 |
| TBC | 16 | 2 | 4 | 46 | 11 | 130 |

¹% Reactores obtenidos en el saneamiento previo (IDTB); ²Obtención de la calificación OTF; ³Norte, centro o sur de España; ⁴Animales en los que se confirmó la infección tuberculosa (cultivo microbiológico positivo y/o presencia de lesiones compatibles con la enfermedad); ⁵Última calificación OTF otorgada; ⁶Por motivos relacionados con el manejo del ganado el muestreo se realizó en varios meses.

3.1.1.1.2. Diseño experimental

Para valorar el efecto de la posición en el resultado de la IDTB en el presente estudio se inoculó la PPD bovina a todos los animales (n=1.066) en más de una localización, y se realizó el cultivo microbiológico en todos aquellos sacrificados (n=468).

IDTB

Los animales (n=210) de las explotaciones calificadas OTF 1, 2 y 3 recibieron dos inoculaciones de la PPD bovina utilizada en la campaña oficial de erradicación de tuberculosis bovina (CZ Veterinaria, España). Una inoculación se realizó siempre en la zona cervical

anterior (posición 1, Figura 13), mientras que la otra se rotó aleatoriamente en la zona cervical posterior (posición 2), escápula (posición 3) y pre-escápula (posición 4) en aproximadamente un tercio de los animales cada una. En cada inoculación se administró 0,1 ml de PPD bovina (1 mg/ml, 2.500 IU), con el sistema de inyección Dermojet basado en aire comprimido (y que no emplea agujas).

En la explotación calificada OTF 4 y en las cinco explotaciones con infección natural (n=856) se efectuaron ocho inoculaciones de PPD bovina por animal (cuatro a cada lado): dos en la zona cervical anterior (posiciones 1 y 5), dos en la zona cervical posterior (posiciones 2 y 6), dos en la zona pre-escapular (posiciones 3 y 7) y dos en la zona escapular (posiciones 4 y 8). Las posiciones 1 – 4 se realizaron en el lado izquierdo, y las 5 – 8 en el derecho (Figura 13).

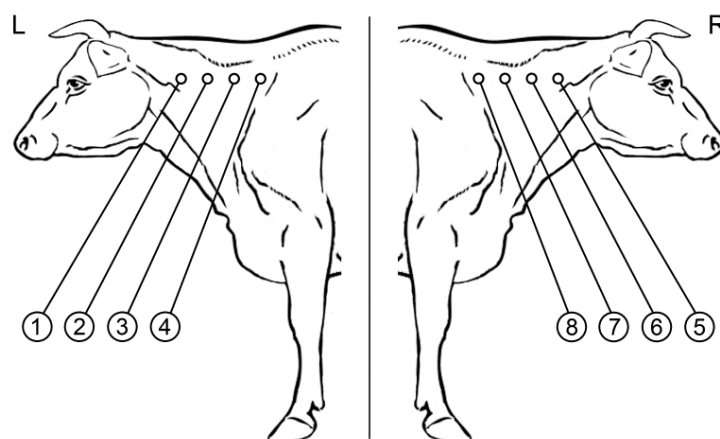


Figura 13. Inoculaciones realizadas para estudiar el efecto de la posición de la inoculación de la PPD bovina en la IDTB: 1 y 5 zona cervical anterior; 2 y 6 zona cervical posterior; 3 y 7 zona pre-escapular; 4 y 8 zona escapular. L: Lado izquierdo (*left*), R: Lado derecho (*right*). Imagen publicada por Casal *et al.*, 2015 (Anexo VI).

La inoculación de la PPD bovina en los animales de las explotaciones calificadas OTF se realizó entre 6 ó 12 meses después del saneamiento anterior, mientras que en las explotaciones infectadas, la inoculación se realizó entre 2 y 6 meses tras el saneamiento anterior, de acuerdo a la normativa nacional (MAGRAMA, 2015). La realización e interpretación de los resultados obtenidos en la IDTB se hizo de acuerdo con la normativa nacional (Real Decreto 2611/1996) y europea (Directiva Europea 64/432/CEE) (Anexo I). Para la realización de la IDTB se rasuró el pelo del animal en la zona de inoculación, se midió el grosor del pliegue cutáneo empleando un cutímetro, y se inoculó la dosis especificada de PPD bovina en la dermis. Posteriormente, el mismo veterinario que realizó la medición antes de la inoculación midió el grosor del pliegue de la piel 72 (± 4) horas tras la inoculación de la PPD bovina empleando el mismo cutímetro y valorando la presencia y/o ausencia de signos clínicos.

La interpretación de la IDTB (estándar o severa) se realizó en función de la situación epidemiológica de la explotación. En las explotaciones calificadas OTF, con el fin de evaluar el posible impacto de aplicar una u otra interpretación sobre los resultados del estudio, se aplicaron las dos interpretaciones de la IDTB, mientras que en las explotaciones infectadas se empleó únicamente la interpretación severa de la prueba (Anexo I).

Cultivo microbiológico

Todos los animales positivos a la IDTB, interpretada en función de la lectura obtenida en la posición 3 (zona pre-escapular), se sacrificaron entre 15 días y 2 meses tras la realización de la prueba. Además, en las explotaciones infectadas 2, 3, 5a y 5b se realizó un vacío sanitario (sacrificio de todos los animales de la explotación independientemente del resultado obtenido en la prueba IDTB) debido a la infección crónica de tuberculosis existente en el rebaño.

En el matadero, se realizó una inspección macroscópica para identificar lesiones compatibles con tuberculosis, y se recogieron muestras de tejido (linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos y bronquiales, pulmón y cualquier otro órgano/linfonodo con lesiones compatibles) para la posterior realización del cultivo microbiológico. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

Para realizar el cultivo microbiológico, se preparó una mezcla de las muestras recogidas de un mismo animal (aproximadamente 2 gramos de tejido de cada órgano y linfonodo), que se descontaminó con cloruro hexadecilpiridinio (HPC) a la concentración final de 0,37% (Corner & Trajstman, 1988). La descontaminación se realizó mediante homogeinización mecánica, tras la cual se decantó el sobrenadante para sembrar el sedimento en medios específicos para el crecimiento de micobacterias (Coletsos y Lowenstein-Jensen). Los medios de cultivo fueron evaluados periódicamente cada 15 días hasta un periodo máximo de tres meses, para la detección de colonias compatibles con micobacterias. En el caso de detectarse crecimiento en el medio de cultivo, se tomó muestra de una colonia para extraer ADN e identificar el aislado mediante una PCR específica para miembros del MTBC (Wilton & Cousins, 1992).

3.1.1.1.3. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico del presente estudio experimental, el resultado cuantitativo (incremento del espesor de la piel en mm obtenido en todas las localizaciones en las que se realizó la IDTB) y cualitativo (reacción positiva o negativa) se registraron en una base de datos, que incluyó también la edad en el momento del análisis, y el sexo de cada animal. Para evaluar la especificidad de la IDTB en las explotaciones libres de tuberculosis se

asumió que los animales que reaccionaron a la IDTB eran falsos positivos, dado el historial de OTF durante al menos dos años.

Para la evaluación del efecto del punto de inoculación en la probabilidad de inducir una reacción positiva en los animales procedentes de rebaños infectados se utilizó un modelo Bayesiano mixto de regresión logística ajustando por el posible efecto de algunas características individuales (edad y sexo). Para este análisis en primer lugar se asumió que la respuesta observada en cada punto de inoculación “i” del animal “j” procedente de la explotación “k” $y_{i,j,k}$, seguía una distribución de Bernouilli con probabilidad $p_{i,j,k}$ de ser positiva

$$y_{i,j,k} \sim \text{Bernouilli}(p_{i,j,k}),$$

En una segunda fase se estudió el efecto de las distintas variables (punto de inoculación, sexo y edad) sobre $p_{i,j,k}$ mediante una regresión logística. El punto de inoculación se incluyó en los modelos de tres maneras alternativas: como una variable categórica (con ocho valores posibles), descompuesta en dos covariables [lado (izquierdo/derecho) y distancia al cuello como una variable continua (1-4) para evaluar un posible gradiente craneal-caudal] y con una tercera categorización idéntica a la anterior pero transformando la distancia al cuello en cuatro posibles categorías independientes (zona cervical anterior, zona cervical posterior, zona pre-escapular y zona escapular). El efecto de la edad (como variable continua categorizada en cuartiles) y el sexo fue evaluado en todos los modelos. Para introducir en el análisis la ausencia de independencia entre las observaciones procedentes de un mismo animal por un lado y las procedentes de animales de un mismo rebaño por otro, todos los modelos incluyeron un factor aleatorio $U_{j,k}$. Así, el modelo final tomó la forma

$$\text{logit}(p_{i,j,k}) = \beta_0 + \beta_i + \beta_1 X_{1,i,j,k} + \dots + \beta_h X_{h,i,j,k} + U_{j,k}$$

donde β_i representa el coeficiente β asociado con la posición “i”, β_h mide el efecto de la variable X_h dependiente del animal “j” procedente de la explotación “k” y

$$U_{j,k} \sim \text{Normal}(Z_k, \sigma_U)$$

representa el efecto aleatorio asociado al animal “j” de la explotación “k”. El efecto aleatorio se introdujo en el modelo asumiendo una distribución normal centrada en Z_k , dependiente de la explotación “k”. Z_k a su vez se definió con una distribución normal, de modo que

$$Z_k \sim \text{Normal}(0,1)$$

Para la estimación de los coeficientes regresión β_0 y β_i se utilizaron distribuciones a priori normales con media 0 y varianza 10, mientras que en el caso de los coeficientes β_h la varianza se amplió a 1.000; se asumió que σ_U seguía una distribución uniforme (0,1-10). Con el fin de garantizar la convergencia de los modelos fue necesario un *prior* informativo para Z_k en la estructura de efectos aleatorios que permitiera obtener resultados identificables. Para evaluar el grado de significación de los resultados en el contexto Bayesiano se calculó la probabilidad Bayesiana posterior (*Bayesian posterior probability*: POPR), definida como la

proporción de simulaciones de Monte Carlo en las que el *odds ratio* (OD) estimado para cada uno de los coeficientes fue inferior o superior a 1. Los modelos se ajustaron empleando el programa de libre distribución WinBUGS 1.4 (Lunn *et al.*, 2000) a través de R (Team, 2014) mediante el paquete R2WinBugs (Sturtz *et al.*, 2005). En las simulaciones se utilizaron tres cadenas de Markov Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*, MCMC), iniciándose cada una de ellas en diferentes valores para asegurar la convergencia visualmente. La autocorrelación fue eliminada de las estimaciones conservando 1 de cada 10 estimaciones consecutivas. Posteriormente, se comprobó formalmente la convergencia del modelo empleando el parámetro \hat{R} de Gelman-Rubin (Brooks & Gelman, 1998, Gelman & Rubin, 1992). Los modelos se analizaron durante 2.500 simulaciones tras haber descartado las primeras 2.500. El mejor modelo fue seleccionado empleando el *deviance information criterion* (DIC) (Spiegelhalter *et al.*, 2002). Con el fin de garantizar el ajuste del modelo a los datos se utilizó el modelo final ajustado para generar mediante simulación predictiva series de datos que fueron comparadas con los datos observados (Gelman & Hill, 2007), mediante la función $F(y_{i,j,k})$,

$$F(y_{i,j,k}) = |O_{i,j,k} - P_{i,j,k}|$$

que compara los resultados observados en la localización “i” del animal “j” en la explotación “k” ($O_{i,j,k}$) con la probabilidad $P_{i,j,k} = P(O_{i,j,k}=1)$ de obtener un resultado positivo, de modo que valores cercanos a 0 se consideraron indicativos de un buen ajuste.

Incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas

Para analizar el incremento de la sensibilidad de la IDTB según el número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas se realizó un análisis exploratorio mediante el programa *Software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS V.20 IBM Inc., Chicago, IL, USA) empleando el resultado cuantitativo (incremento del espesor de la piel en mm, medido tras la inoculación de la PPD bovina) y cualitativo (reacción positiva o negativa) de los animales en los que se confirmó la infección. Además, se evaluaron todas las posibles combinaciones de 1 a 8 elementos de entre las respuestas registradas en cada uno de los 8 puntos inoculados en cada animal, con el fin de determinar la probabilidad de detectar un animal, si dichas respuestas eran elegidas al azar. Los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron mediante el método de Wilson analizando los datos con el programa *Win Pepi* [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35].

3.1.1.2. Resultados

Efecto de la posición en el resultado de la IDTB

En los animales procedentes de las explotaciones calificadas OTF no hubo ninguna respuesta positiva independientemente del criterio aplicado para la interpretación de la prueba

de la IDTB. La diferencia del grosor del pliegue de la piel fue en todos los casos inferior o igual a 2 mm y no se observó ningún signo clínico. La explotación OTF 4 (n=38) fue sometida a un vacío sanitario por razones no relacionadas con la tuberculosis, tras el que todos los animales fueron inspeccionados y muestreados en el matadero para el análisis bacteriológico con el fin de comprobar la ausencia de enfermedad. Los resultados negativos obtenidos en todos los casos confirmaron dicha hipótesis.

En los animales procedentes de explotaciones infectadas, se observó una elevada variabilidad de la respuesta a la prueba en función de la posición analizada (Tabla 3). Del total de animales (n=818) hubo 283 [34,6%, IC 95%, 31,4-37,9] reactores en al menos uno de los ocho puntos inoculados mientras que 79 (27,9%, IC 95%, 23,0-33,4) reaccionaron en todas las inoculaciones, y 42 (14,8%, IC 95%, 11,1-19,5) reaccionaron únicamente en una. De los animales que reaccionaron en al menos un punto, hubo diez que se consideraron reactores a la IDTB por presentar únicamente signos clínicos en alguna o en varias localizaciones tras la inoculación de la PPD bovina (sin que el incremento en el grosor de la piel superara los dos mm). Sin embargo, debido al dado el pequeño tamaño de la muestra, no se pudo asociar la presencia de signo clínico con ninguna posición determinada.

Las localizaciones en las que se obtuvo una mayor proporción de respuestas positivas a la IDTB en los animales reactores en algún punto (n=283) fueron la 1 y la 5 (zona cervical anterior en ambos lados) con un 23-24% de reactores. Al analizar los resultados obtenidos en cada una de las explotaciones estudiadas se observaron diferencias en función del rebaño, siendo las explotaciones 4 y 5b las únicas en las que el mayor porcentaje de reactores se obtuvo en las posiciones 1 y 5 (Tabla 3). Respecto a la respuesta cuantitativa obtenida en los animales reactores en algún punto (n=238) se observó como la media (mm) obtenida en la zona cervical anterior (3,65) fue ligeramente superior a los valores descritos en la zona cervical posterior (3,19) y las zonas pre-escapular (3,01) y escapular (3,10) respectivamente. No se observó un efecto estadísticamente importante en función del lado en el que se realizó la inoculación de la PPD bovina.

El mejor modelo (indicado por el menor valor DIC) fue aquel en el que la posición se categorizó en 8 categorías distintas, y que incluía la edad de los animales en cuartiles (Q) como covariable. En la Tabla 4 se muestra el OR para la obtención de una respuesta positiva a la IDTB en todas las localizaciones estudiadas, utilizando la posición 1 como referencia.

Los OR obtenidos asociados a cada posición fueron muy variables, si bien las posiciones 2-4 y 6-8 (zona cervical posterior y escapular) presentaron un menor riesgo de obtener un resultado positivo a la IDTB comparados con la posición 1 (POPR de tener un OR <1 entre 88 y 100%), mientras que la posición 5 fue la única en la que el OR fue superior (POPR de tener un OR >1 de 92,4%). La edad de los animales se asoció con el resultado de la IDTB, observándose en los animales con edades comprendidas desde el segundo al cuarto

cuartil (>1,92 años) un mayor riesgo de obtener una respuesta positiva. Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre la respuesta obtenida y el sexo del animal.

Tabla 3. Número y porcentaje de reactores obtenido en cada posición (1-4 lado izquierdo, 5-8 lado derecho); media y desviación estándar (*standard deviation*: SD) obtenidos en los animales procedentes de explotaciones infectadas (n=818).

| Explotaciones | Zona cervical anterior | | Zona cervical posterior | | Zona pre-escapular | | Zona escapular | | Reactores ¹ |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| | Posición 1 | Posición 5 | Posición 2 | Posición 6 | Posición 3 | Posición 7 | Posición 4 | Posición 8 | |
| 1 (n=138) | 7: 5,0% (2,5-10,1) ² 0,78 (1,05) ³ | 12: 8,7% (5-14,6) 0,72 (1,17) | 7: 5,0% (2,5-10,1) 0,64 (0,99) | 6: 4,3% (2,0-9,2) 0,66 (0,97) | 7: 5,0% (2,5-10,1) 0,75 (0,94) | 7: 5,0% (2,48-10,1) 0,92 (1,00) | 10: 7,2% (4,0-12,8) 0,80 (1,17) | 8: 5,8% (3,0-11,0) 0,95 (1,05) | 19: 13,8% (9,0-20,5) 2,14 (1,74) |
| 2 (n=43) | 1: 2,3% (0,4-12,1) 0,53 (0,85) | 2: 4,6% (1,3-15,5) 0,53 (0,85) | 2: 4,6% (1,3-15,5) 0,70 (1,22) | 2: 4,6% (1,3-15,5) 0,72 (1,22) | 3: 6,9% (2,4-18,6) 0,79 (1,10) | 2: 4,6% (1,28-15,5) 0,60 (0,93) | 3: 6,9% (2,4-18,6) 0,72 (0,80) | 2: 4,6% (1,3-15,5) 0,63 (0,87) | 4: 9,3% (3,7-21,6) 2,75 (1,78) |
| 3 (n=92) | 5: 5,4% (2,3-12,1) 0,68 (0,95) | 10: 10,9% (6-18,9)* 0,76 (0,96) | 1: 1,1% (0,2-5,9)* 0,71 (0,72) | 8: 8,7% (4,5-16,2) 0,83 (0,98) | 7: 7,6% (3,7-14,9) 0,92 (0,85) | 5: 5,4% (2,34-12,1) 0,82 (0,91) | 7: 7,6% (3,7-14,9) 1,10 (0,80) | 8: 8,7% (4,5-16,2) 1,02 (0,96) | 23: 25,0% (17,3-34,7) 1,51 (1,24) |
| 4 (n=347) | 58: 16,7% (13,2-21,0) 1,16 (1,64) | 58: 16,7% (13,2-21,0) 1,18 (1,68) | 43: 12,4% (9,3-16,3) 0,99 (1,42) | 49: 14,1% (10,8-18,2) 0,99 (1,41) | 45: 13,0% (9,8-16,9) 0,93 (1,30) | 37: 10,7% (7,8-14,3) 0,86 (1,31) | 44: 12,7% (9,6-16,6) 1,03 (1,35) | 44: 12,7% (9,6-16,6) 0,92 (1,27) | 91: 26,2% (21,9-31,1) 2,72 (1,64) |
| 5a (n=43) | 15: 34,9% (22,4-49,8) 2,16 (2,88) | 15: 34,9% (22,4-49,8) 2,37 (2,83) | 15: 34,9% (22,4-49,8) 2,19 (2,92) | 14: 32,5% (20,5-47,5) 2,44 (3,18) | 16: 37,2% (24,4-52,1) 2,28 (2,95) | 16: 37,2% (24,4-52,1) 2,40 (3,00) | 14: 32,5% (20,5-47,5) 2,09 (2,62) | 16: 37,2% (24,4-52,1) 2,49 (3,00) | 18: 41,9% (28,4-56,7) 4,98 (2,69) |
| 5b (n=155) | 101: 65,2% (57,4-72,2) 3,72 (2,66) | 103: 66,4% (58,7-73,4) 3,88 (2,73) | 98: 63,2% (55,4-70,4) 3,30 (2,20) | 97: 62,6% (54,7-69,8) 3,32 (2,39) | 94: 60,6% (52,8-68,0) 3,20 (1,94) | 91: 58,7% (50,8-66,2) 2,98 (2,11) | 93: 60,0% (52,1-67,4) 3,15 (2,08) | 98: 63,2% (55,4-70,4) 3,09 (2,19) | 128: 82,6% (75,8-87,7) 3,89 (2,15) |
| Total (n=818) | 187: 22,9% (20,1-25,9) 1,55 (2,11) | 200: 24,4% (21,6-27,5) 1,59 (2,18) | 166: 20,3% (17,7-23,2) 1,39 (1,86) | 176: 21,5% (18,8-24,5) 1,42 (1,94) | 172: 21,0% (18,4-23,9) 1,39 (1,74) | 158: 19,3% (16,8-22,2) 1,33 (1,76) | 171: 20,9% (18,3-23,8) 1,44 (1,74) | 176: 21,5% (18,8-24,5) 1,41 (1,78) | 283: 34,6% (31,4-37,9) 3,25 (2,14) |

¹Animal con alguna reacción positiva a la IDTB; ²IC Wilson; ³Media y desviación estándar (SD); *IC no superpuestos.

Tabla 4. Estimación del efecto de la posición en la probabilidad de obtener una respuesta positiva a la IDTB en 817 animales procedentes de explotaciones infectadas de forma natural. Se consideró la posición 1 (zona cervical anterior del lado izquierdo) como la categoría de referencia.

| Variable | | Media β (SD) | Rhat | Median OR (95%) ¹ |
|---------------------------|----------------------------|-----------------------|--------|---------------------------------|
| Lado Izquierdo | 1. Zona cervical anterior | 0 | - | 1 |
| | 2. Zona cervical posterior | -0,53 (0,22) | 1,0014 | 0,59 (0,38-0,87) |
| | 3. Zona pre-escapular | -0,38 (0,22) | 0,9996 | 0,69 (0,45-1,07) |
| | 4. Zona escapular | -0,39 (0,22) | 1,0052 | 0,68 (0,44-1,04) |
| Lado Derecho | 5. Zona cervical anterior | 0,31 (0,21) | 1,0034 | 1,37 (0,90-2,06) |
| | 6. Zona cervical posterior | -0,30 (0,22) | 0,9995 | 0,74 (0,50-1,16) |
| | 7. Zona pre-escapular | -0,72 (0,23) | 1,0005 | 0,49 (0,32-0,77) |
| | 8. Zona escapular | -0,26 (0,21) | 1,0062 | 0,77 (0,51-1,17) |
| Edad (años) | 1Q (0,20-1,91) | 0 | - | 1 |
| | 2Q (1,92-4,33) | 1,14 (0,60) | 1,0246 | 3,11 (1,07-11,3) |
| | 3Q (4,34-8,29) | 1,21 (0,59) | 1,0410 | 3,34 (1,20-13,4) |
| | 4Q (8,3-23,3) | 1,47 (0,57) | 1,0455 | 4,37 (1,62-15,6) |

¹Intervalo calculado con un 95% de probabilidad.

Se alcanzó un nivel adecuado de convergencia en las estimaciones de todos los parámetros ($R_{hat} < 1,01$) y la bondad de ajuste del modelo final se comprobó a través de la función $F(y_{i,j,k})$ [mediana= 0,007, 95% rango intercuartil (*interquartile range*: IQR)=0,00-0,08].

Incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas

Para estudiar el incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas en un mismo animal, se seleccionaron aquellos en los que se confirmó la infección (presencia de lesiones compatibles y/o cultivo microbiológico positivo). De las explotaciones en las que se había confirmado la infección de forma natural, se sacrificó un total de 430 animales. Aquellos que habían sido positivos a la IDTB interpretada en función de la lectura obtenida en la posición 3, y todos los animales procedentes de las explotaciones infectadas 2, 3, 5a y 5b (Tabla 2). Se realizó el cultivo microbiológico de todos ellos, confirmándose la infección en 209 (48,6%). De los 209 animales infectados se detectó al menos una reacción positiva a la prueba IDTB (independientemente de la localización) en 177 animales (84,7% IC 95%, 79,2-88,9), indicando que un 15,3% (32, IC 95%, 11,1-20,8) de animales con tuberculosis se consideraron falsos negativos a la prueba de la IDTB en todas las posiciones estudiadas.

Sobre el total de animales analizados con cultivo y/o lesión (n=209), se evaluaron todas las posibles combinaciones de 1 a 8 elementos de entre las respuestas registradas en los 8 puntos inoculados en cada uno de ellos, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Sensibilidad media obtenida en todas las posibles combinaciones de entre 1 y 8 respuestas obtenidas sobre el total de animales en los que se confirmó la infección (n=209).

| Puntos de inoculación | Animales analizados (n=209) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1 | 119-139 (129) ¹ 61,7% (54,9-68,0) ² |
| 2 | 140-160 (150) 71,8% (65,3-77,4) |
| 3 | 152-166 (159) 76,1% (69,9-81,4) |
| 4 | 160-171 (166) 79,4% (73,4-84,3) |
| 5 | 164-173 (169) 80,9% (75,0-85,6) |
| 6 | 170-175 (173) 82,8% (77,1-87,3) |
| 7 | 174-176 (175) 83,7% (78,1-88,1) |
| 8 | 177-84,7% (79,2-89,0) |

¹Valor medio obtenido del total de animales reactivos cuando la PPD bovina se inoculó en distintas localizaciones de un mismo animal; ²IC Wilson, 95%.

Al tomar un solo punto de inoculación (8 posibles combinaciones), se alcanzó un promedio de 129 animales infectados (61,7%, IC 95%, 54,9-68,0). Al tomar 2 inoculaciones (28 posibles combinaciones), se detectarían en promedio 150 animales infectados (71,8%, IC 95%, 65,3-77,4). Cuando se consideraron tres inoculaciones (56 posibles combinaciones) se identificarían un promedio de 159 animales infectados (76,1%, IC 95%, 69,9-81,4). Al contemplar cuatro inoculaciones (70 posibles combinaciones), se clasificarían de media 166 animales infectados (79,4%, IC 95%, 73,4-84,3). Con cinco inoculaciones (56 posibles combinaciones), se detectarían de media 169 animales infectados (80,9%, IC 95%, 75,0-85,6). Con seis puntos de inoculación de la PPD bovina (28 posibles combinaciones) se identificarían como reactivos una media de 173 animales infectados (82,8%, IC 95%, 77,1-87,3). Con siete puntos de inoculación (8 posibles combinaciones), reaccionarían un promedio de 175 animales infectados (83,7%, IC 95%, 78,1-88,1), mientras que la máxima proporción de animales infectados detectados fue al contemplar las ocho posibles inoculaciones (un único caso), con un promedio de 177 animales infectados detectados (84,7%, IC 95% 79,2-89,0) (Tabla 5).

El incremento de sensibilidad más drástico se produjo cuando se compara la sensibilidad media de la IDTB obtenida en un solo punto con la alcanzada con 2-4 puntos (independientemente de la localización seleccionada). En la Figura 14 se muestra el incremento en la sensibilidad media obtenido en la IDTB al combinar distintos puntos en los que se realizó la inoculación de la PPD bovina.

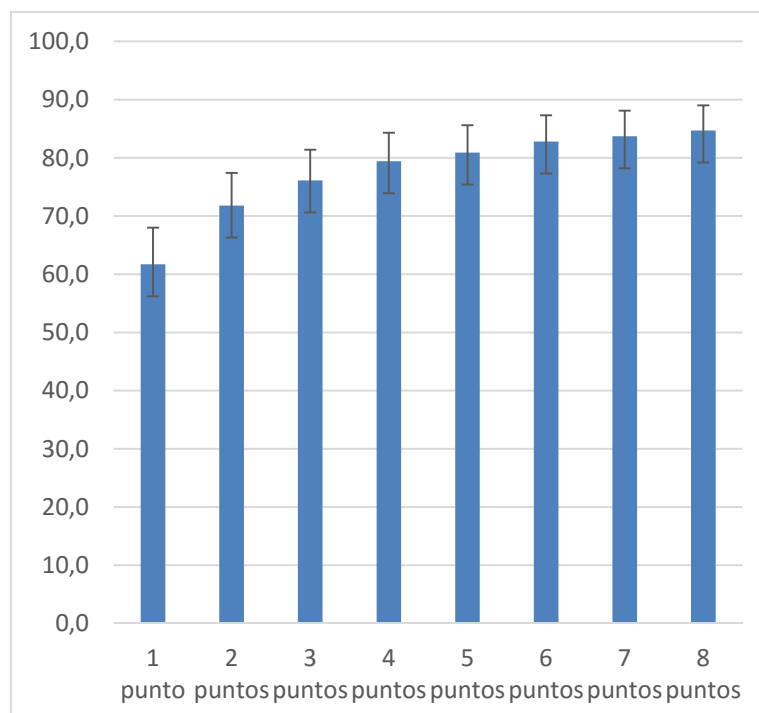


Figura 14. Incremento en la sensibilidad media obtenido en la prueba IDTB al combinar distintos puntos (desde uno hasta ocho) en los que se realizó la IDTB independientemente de la localización sobre 209 animales infectados.

Con el fin de mantener siempre la posición en la que se incrementa la probabilidad de obtener una respuesta positiva a la IDTB (zona cervical anterior independientemente del lado seleccionado), si se aplicara la PPD bovina en los cuatro puntos del lado izquierdo (cervical anterior y posterior, pre-escapular y escapular), se detectarían 165 animales infectados, con un valor de sensibilidad del 78,9% (IC 95%, 72,9-83,9), mientras que si la inoculación se realizara en los mismos cuatro puntos del lado derecho, se identificarían 162 animales, alcanzando una sensibilidad del 77,4% (IC 95%, 71,4-82,7).

2.1.1.3. Resumen

Los resultados obtenidos en el primer estudio experimental ponen de manifiesto que a pesar del limitado número de animales analizados procedentes de explotaciones libres (n=248), el resultado de la prueba IDTB no parece estar afectado por la localización donde se realiza la misma, sugiriendo que la especificidad de la IDTB tampoco se vería afectada por este factor. Sin embargo, los resultados obtenidos sobre animales infectados de manera natural indican que existe una mayor probabilidad de obtener una reacción positiva en la prueba IDTB cervical si la inoculación de la PPD bovina se realiza en la zona cervical anterior, incrementando el riesgo de no detectar animales infectados si la inoculación se realiza en otra posición.

En relación al incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas en un mismo animal, los resultados obtenidos en la proporción de animales infectados parecen indicar que el mayor incremento se registraría al pasar de una a cuatro inoculaciones, si bien haría falta una muestra sobre más animales para confirmar esta tendencia.

3.1.2. Segundo estudio experimental: efecto del criterio de interpretación establecido en el resultado del test de detección de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino procedentes de explotaciones libres e infectadas de forma natural

El segundo estudio experimental se diseñó para valorar el efecto del punto de corte en el resultado del test de detección de IFN- γ . La finalidad del estudio fue aportar información sobre la posible variabilidad existente derivada del uso de diversos puntos de corte empleando el mismo kit comercial, dado que hasta la fecha existía escasa información al respecto. El estudio se realizó con muestras de ganado bovino recogidas tanto de explotaciones libres como infectadas de forma natural, con el fin de poder valorar el efecto de los distintos puntos de corte en la especificidad y la sensibilidad del test, así como comparar la proporción de reactores obtenidos con todos los puntos de corte evaluados. **Este segundo estudio experimental se enmarca dentro del capítulo I.**

3.1.2.1. Material y métodos

3.1.2.1.1. Población en estudio

Para la realización de este trabajo se seleccionaron tres explotaciones calificadas OTF y 221 en las que se había confirmado la infección de forma natural, analizándose un total de 274 muestras de 176 animales de las explotaciones libres, y 66.410 muestras recogidas de 31.488 animales de explotaciones infectadas.

De las tres explotaciones calificadas OTF, dos se situaron en Castilla y León y una en Navarra. Las explotaciones infectadas se localizaron en regiones de alta prevalencia de tuberculosis (superior al 2%) del norte (Castilla y León, n=56.666 muestras) y del centro (Comunidad de Madrid, n=9.744 muestras) de España. Las muestras procedentes de Castilla y León se recogieron de todas las explotaciones de aptitud láctea y de lidia analizadas mediante el test de detección de IFN- γ durante los años 2007-2010 dentro del marco del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina, más una selección aleatoria de entre todas las explotaciones de aptitud cárnica muestreadas durante ese periodo, con el fin de incluir una proporción similar de explotaciones de las tres aptitudes en la muestra final (dado que el número de explotaciones de carne analizadas anualmente es muy superior al de otras aptitudes). En la Comunidad de Madrid (CAM) se incluyeron todos los animales de los

que se recogieron muestras para realizar el test de detección de IFN- γ durante los años 2010 y 2011 procedentes de explotaciones infectadas en el marco del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina. De acuerdo a la legislación nacional y Europea, todos los animales incluidos en el estudio eran mayores de 6 meses, y la separación mínima entre la IDTB y el test de detección de IFN- γ fue siempre de 60 días.

3.1.2.1.2. Diseño experimental

Dado que, de acuerdo con la normativa nacional los animales procedentes de explotaciones infectadas se sanearon cada 2-6 meses (MAGRAMA, 2015), un 77,5% del total de animales incluidos en el estudio ($n=24.403$) se muestreó en más de una ocasión (mediana del número de análisis realizados por animal=2, IQR 1-3). En la mayor parte de los animales procedentes de explotaciones infectadas (99,4%) se recogieron también los resultados de la IDTB cervical (66.410 análisis realizados en paralelo con la IDTB y el test de detección de IFN- γ) mientras que del 0,56% restante (176 animales), solo se dispuso de los resultados del test de detección de IFN- γ .

IDTB

La IDTB se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente (primer estudio experimental), efectuando una única inoculación de la PPD bovina (1 mg/ml; 2.500 IU) (CZ Veterinaria, España) en la zona cervical a los animales procedentes de explotaciones infectadas. Para el análisis de los resultados se empleó la interpretación severa de la prueba (Anexo I).

Test de detección de IFN- γ

La extracción de sangre se realizó empleando tubos con heparina de litio previa realización de la IDTB, y posteriormente las muestras se trasladaron antes de transcurridas 8 horas a los laboratorios autorizados para la realización de este test diagnóstico en cada Comunidad Autónoma. Después de homogeneizar el tubo, de cada muestra de sangre se prepararon tres alícuotas de 1,5 ml en placas de cultivo celular de 24 pocillos usando pipetas Pasteur estériles. Posteriormente cada alícuota se estimuló con 100 μ l de PBS y con PPD aviar y bovina (CZ Veterinaria, España) a una concentración final de 20 μ g/ml, y se dejaron incubar 18-24 horas a 37°C (Rothel *et al.*, 1992). Tras la incubación se recogió el plasma y se conservó a -20°C hasta la realización del ELISA.

El test de detección de IFN- γ se realizó con el kit Bovigam (*Thermo Fisher Scientific, USA*), ya que es el que se empleó en España hasta el año 2015. Es un ELISA diseñado para detectar IFN- γ biológicamente activo de vacuno, ovino y caprino, siguiendo el protocolo descrito previamente (Wood *et al.*, 1990). Para validar los resultados obtenidos en cada placa

se incluyeron 3 controles positivos y 3 negativos. El resultado final de cada muestra (positiva o negativa) se calculó en función del valor de DO obtenido en cada pocillo estimulado con PBS, PPD aviar y PPD bovina respectivamente. De acuerdo con la interpretación recogida en el Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina, se consideró un animal positivo cuando:

- La DO PPD bovina (muestra estimulada con PPD bovina) – DO PBS (muestra estimulada con PBS) fue igual o superior a 0,05 y
- La DO PPD bovina fue superior a DO PPD aviar (muestra estimulada con PPD aviar).

Cultivo microbiológico

Todos los animales positivos a la IDTB y/o al test de detección de IFN- γ (n=4.159) se sacrificaron en un plazo de 15 días tras la realización del muestreo. Aproximadamente dos tercios de los animales sacrificados se inspeccionaron en el matadero (n=2.552), realizando la toma de muestras para el cultivo microbiológico. Una proporción de animales negativos a las pruebas diagnósticas (n=641) fue también sacrificada 15 días tras la realización de las mismas y muestreada en el matadero de igual forma que los animales reactivos. Estos animales se sacrificaron por motivos relacionados con tuberculosis (animales negativos a las pruebas diagnósticas pero con valores próximos a los puntos de corte, sospecha de anergia, etc.) y/o económicos (baja productividad).

Las muestras procedentes de animales de las explotaciones de la CAM fueron procesadas e inoculadas en medios sólidos según el protocolo descrito anteriormente (primer estudio experimental). Las muestras procedentes de animales de Castilla y León fueron analizadas siguiendo un protocolo alternativo, basado en el uso de un sistema de cultivo líquido automatizado (Hines *et al.*, 2006). Las muestras procedentes de un mismo animal se homogeneizaron y descontaminaron con una solución de N-acetil-cisteína e hidróxido de sodio (NALC-NaOH) MycroPrep (*Becton Dickinson, USA*), y fueron centrifugadas durante 20 minutos a 1.300 g, y posteriormente resuspendidas en 1-3 ml de PBS. A continuación, se inoculó esa suspensión en un medio líquido (sistema BACTEC MGIT) suplementado con PANTA (una mezcla antibiótica compuesta por poliximina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina). La monitorización del cultivo se realizó cada hora durante el periodo de incubación (42 días) para la detección de crecimiento compatible con miembros del MTBC, y los aislados obtenidos se identificaron mediante PCR.

3.1.2.1.3. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos en el test de detección de IFN- γ se analizaron aplicando el criterio de interpretación actualmente en uso en el Programa Nacional de

Erradicación de Tuberculosis Bovina y, alternativamente, otros criterios empleados por países miembros de la Unión Europea y por los Estados Unidos (Tabla 6). El criterio empleado en Francia no se incluyó ya que para su cálculo es necesario incluir el valor de los controles negativos y positivos de cada placa, dato no disponible en este estudio.

Tabla 6. Criterios empleados en la interpretación del test de detección de IFN- γ para la realización del segundo estudio experimental.

| Criterios | PPD bovina vs. PBS (punto de corte A) | PPD bovina vs. PPD aviar (punto de corte B) | País |
|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| C1 | PPDb _{DO} - PBS _{DO} ≥ 0,05 | PPDb _{DO} > PPDa _{DO} | España, Portugal, Polonia ¹ |
| C2 | PPDb _{DO} – PBS _{DO} ≥ 0,1 | | Alemania ¹ |
| C3 | - | PPDb _{DO} – PPDa _{DO} ≥ 0,1 | Reino Unido |
| C4 | PPDb _{DO} - PBS _{DO} > 0,1 | PPDb _{DO} – PPDa _{DO} > 0,1 | Austria ¹ |
| C5 | PPDb _{DO} - PBS _{DO} ≥ 0,1 | | Hungría |
| C6 | | PPDb _{DO} – PPDa _{DO} ≥ 0,1 | Rumania, Grecia, EEUU |
| C7 | PPDb _{DO} - PBS _{DO} ≥ 0,05 | PPDb _{DO} > PPDa _{DO} ² | Irlanda |
| C8 | PPDb _{DO} /PBS _{DO} ≥ 2 | PPDb _{DO} – PPDa _{DO} ≥ 0,05 | Italia |

¹País declarado OTF; ²Para considerar una muestra positiva el $PPDb_{DO}$ tiene que ser $>0,1$. $PPDb_{DO}$: DO de la muestra estimulada con PPD bovina; PBS_{DO} : DO de la muestra estimulada con PBS; $PPDa_{DO}$: DO de la muestra estimulada con PPD aviar.

De las muestras procedentes de Castilla y León solo se dispuso del valor de la resta (valor de DO obtenido al estimular la sangre con la PPD aviar y la PPD bovina menos el valor de DO obtenido en el pocillo estimulado con el PBS), en lugar de los valores de DO obtenidos de las muestras estimuladas con PBS, PPD aviar y bovina, y por este motivo los criterios 7 y 8 se utilizaron únicamente en el análisis de las muestras procedentes de la CAM. Excepto el criterio 3, todos los demás evaluados en el presente trabajo tienen en cuenta para su interpretación el valor de DO obtenido por la PPD bovina menos el del PBS (punto de corte A) y el valor de DO de la PPD bovina menos el de la PPD aviar (punto de corte B). En el C8 el punto de corte A consiste en la relación del valor de DO de la PPD bovina/valor de DO del PBS.

Previo al análisis estadístico, se analizó la normalidad en la distribución de los datos obtenidos y la relación entre la respuesta a la prueba en función del punto de corte, la región de procedencia del animal, la aptitud, y la edad se comparó con tests no-paramétricos (Chi-cuadrado, McNemar y Wilcoxon). La concordancia se calculó empleando el estadístico kappa y los intervalos de confianza (IC) del 95%, se obtuvieron mediante el método de Wilson analizando los datos con el programa *Win Pepi* [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35].

Aquellos animales en los que se confirmó la infección (cultivo microbiológico positivo) fueron seleccionados para calcular la sensibilidad relativa al cultivo empleando los distintos puntos de corte analizados. No se pudo estimar la sensibilidad real ya que únicamente se sacrificó una pequeña proporción de animales negativos a las pruebas diagnósticas. Para

determinar la especificidad de los criterios evaluados, se emplearon los datos de las explotaciones libres (asumiendo que todos los reactores fueron falsos positivos).

Con el fin de evaluar la asociación de ciertas variables individuales con los resultados obtenidos en el test de detección de IFN- γ en los animales sacrificados, se registró la aptitud y el número de muestreos previos realizados con dicho test desde el inicio del brote en la explotación. En el caso de los animales procedentes de Castilla y León también se registró la edad en el momento del saneamiento. La asociación entre las tres variables individuales (edad, aptitud y número de análisis previos realizados) y la probabilidad de que una muestra procedente de un animal infectado (con cultivo positivo) fuera clasificada como positiva en el test de IFN- γ empleando el C1 y negativa con los demás se evaluó empleando un modelo multivariable mixto de regresión logística que se implementó mediante el paquete lme4 (Bates *et al.*, 2011). El modelo multivariable mixto de regresión logística incluido en el presente trabajo contempla dos posibles respuestas: respuesta (positiva/negativa) al C2 de los animales infectados detectados con el C1 (variable respuesta 1), y respuesta con los criterios C3-C6 (que ofrecieron resultados virtualmente idénticos) de los animales infectados detectados con el C1 (variable respuesta 2). Finalmente, el análisis multivariable se realizó únicamente con los datos de los animales procedentes de las explotaciones infectadas de Castilla y León ($n=598$), ya que hubo información de las muestras procedentes de la CAM que no se pudo registrar.

Para tener en cuenta la falta de independencia en las observaciones procedentes de una misma explotación, este factor se incluyó en todos los modelos como un efecto aleatorio. Se analizaron todas las posibles interacciones de segundo nivel entre las variables explicativas significativas, y el modelo final incluyó sólo aquellas variables significativas ($p<0,05$); su rendimiento predictivo se evaluó utilizando una curva ROC (*receiver operating characteristic*). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa R (R development core team, 2011).

Con el fin de cuantificar el efecto de la modificación de los puntos de corte A y B sobre la sensibilidad relativa (en animales con infección confirmada) y la especificidad (en animales de rebaños libres), éstos parámetros y su semisuma fueron calculados para todas las posibles combinaciones de valores en los puntos de corte A y B entre 0 y 0,2 (en incrementos de 0,0125).

3.1.2.2. Resultados

Muestras procedentes de explotaciones calificadas OTF

A continuación se muestran los resultados del análisis de las muestras procedentes de las explotaciones OTF con los criterios C1, C2 y C3, ya que con los otros criterios se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el C3. Los resultados obtenidos en los 274

análisis realizados con las muestras procedentes de las tres explotaciones calificadas OTF [A (n=100), B (n=40) y C (n=40)] se detallan en la Tabla 7.

Las explotaciones A y C se muestrearon una única vez, en la que se detectaron 11 resultados positivos en la explotación A, y ninguno en la C mediante la aplicación del C1 (Tabla 7). En la explotación B los animales se muestrearon cuatro veces en intervalos de aproximadamente cinco semanas, desde los 6 meses hasta que se sacrificaron con una edad de 11-12 meses (134 muestras en total), entre las cuales se detectaron 6 resultados positivos (con el C1).

Tabla 7. Reactores y especificidad obtenidos con las muestras procedentes de las explotaciones calificadas OTF empleando los criterios C1, C2 y C3 en el test de detección de IFN- γ .

detección de H-N-v.

| Explotaciones OTF | | A | B | | | | C | Total |
|-------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Nº Animales | | | M1 ¹ | M2 | M3 | M4 | | |
| Nº Animales | | 100 | 36 | 33 | 33 | 32 | 40 | 247 |
| C1 | Reactores | 11 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 17 |
| | Sp ² | 89% (81,4-93,8) ³ | 91,7% (78,2-97,1) | 93,9% (80,4-98,3) | 97% (84,7-99,5) | 100% (89,3-100) | 100% (91,2-100) | 93,8% (89,3-95,7) |
| C2 | Reactores | 8 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 11 |
| | Sp | 92% (85,0-95,9) | 97,2% (85,8-99,5) | 93,9% (80,4-98,3) | 100% (89,6-100) | 100% (89,3-100) | 100% (91,2-100) | 96% (92,2-97,5) |
| C3 | Reactores | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Sp | 98% (93,0-99,5) | 97,2% (85,8-99,5) | 100% (89,6-100) | 100% (89,6-100) | 100% (89,3-100) | 100% (91,2-100) | 98,9% (96,5-99,6) |

¹M1-M4: Muestreo 1, 2, 3 y 4 realizados en la explotación B; ²Sp: Especificidad; ³IC Wilson, 95%.

A pesar del limitado tamaño de la muestra, los IC del 95% obtenidos fueron en todos los casos superiores al 80%, con un valor global estimado del 90-98% (C1 y C2) y 97-100% (C3-C6). La especificidad más elevada se observó en la explotación C (aptitud cárnica), ya que no se detectó ningún animal reactor con ninguno de los criterios analizados (C1, C2 y C3). En la explotación B se observó mayor especificidad a medida que se incrementaba la edad de los animales muestreados empleando los tres criterios evaluados, aunque no se observaron diferencias significativas (test de Chi-cuadrado, $p=0,08$) entre los resultados obtenidos en los sucesivos muestreos.

El empleo de distintos puntos de corte resultó en una diferente proporción de animales detectados con los distintos criterios evaluados en el test de detección de IFN- γ , observándose diferencias significativas en el resultado cualitativo de la prueba entre los criterios C1, C2 y C3 (test de McNemar, $p<0,05$).

Muestras procedentes de explotaciones infectadas

De las 66.410 muestras procedentes de explotaciones infectadas, hubo 4.159 (6,3%, IC 95%, 6,1-6,5) reactores a la IDTB y/o al test de detección de IFN- γ ; de éstos, un total de 325 (7,8%, IC 95%, 7,0-8,7) animales fueron positivos a las dos pruebas diagnósticas simultáneamente, 255 (6,1%, IC 95%, 5,4-6,9) fueron positivos únicamente a la IDTB y 3.579 (86,1%, IC 95%, 85,0-87,1) reaccionaron sólo al test de detección de IFN- γ . Del total de animales sacrificados en función de los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas ($n=4.159$) se realizó el cultivo microbiológico en 2.552 (61,4%), confirmándose la infección en 834 animales (32,7% de los cultivados). De los 641 animales negativos que se sacrificaron se confirmó la infección en 85 (13,3%).

En la Tabla 8 se detallan los resultados obtenidos en las muestras procedentes de explotaciones infectadas en función del criterio aplicado. Se observaron diferencias significativas en la proporción de animales detectados en función del punto de corte (test de McNemar, $p<0,001$): sobre el total de muestras analizadas el C1 detectó aproximadamente 1,5 veces más reactores que el C2, y 2,4-2,5 más reactores que los criterios C3-C6 (criterios que obtuvieron resultados prácticamente idénticos), mientras que el C2 detectó 1,6 más reactores que los criterios C3-C6. La proporción de reactores obtenidos al analizar las muestras procedentes de Castilla y León fue menor con todos los criterios evaluados. Además, las diferencias en la proporción de reactores obtenidos con los distintos criterios incluidos, fueron más acusadas en estas muestras que con aquellas procedentes de la CAM. El número de reactores obtenido con los criterios C7 y C8 sobre las muestras de la CAM fue intermedio entre los alcanzados aplicando los criterios C1 y C2 y los obtenidos con los criterios C3-C6 (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de reactores (IC 95%) obtenidos en las muestras procedentes de explotaciones infectadas con los 8 criterios empleados para la interpretación del test de detección de IFN- γ .

| Criterios | Castilla y León | CAM | Total |
|------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
| C1 | 5,47% (5,3-5,7) ¹ | 8,23% (7,7-8,8) | 5,88% (5,7-6,1) |
| C2 | 3,46% (3,3-3,6) | 6,08% (5,6-6,6) | 3,84% (3,7-4,0) |
| C3 | 2,11% (2,0-2,2) | 4,31% (3,9-4,7) | 2,43% (2,3-2,6) |
| C4 | 2,01% (1,9-2,1) | 4,23% (3,9-4,7) | 2,34% (2,2-2,5) |
| C5 | 2,01% (1,9-2,1) | 4,23% (3,9-4,7) | 2,34% (2,2-2,5) |
| C6 | 2,02% (1,9-2,1) | 4,23% (3,9-4,7) | 2,34% (2,2-2,5) |
| C7 | - | 7,78% (7,3-8,3) | - |
| C8 | - | 5,29% (4,9-5,8) | - |
| Análisis | 56.666 | 9.744 | 66.410 |

¹IC Wilson, 95%.

Al analizar la edad (dato registrado únicamente en las muestras procedentes de Castilla y León) de los reactores obtenidos utilizando C1 y C2 comparado con los criterios C3-C6, no se detectaron diferencias significativas, aunque es destacable que los animales que

reaccionaron con el C1 o el C2 fueron más jóvenes que los que reaccionaron empleando los criterios C3-C6 (test de Wilcoxon, C1 frente a C3-C6: $p=0,07$; C2 contra C3-C6: $p=0,10$), mientras que al analizar la edad entre los resultados obtenidos con el C1 y el C2 no se observó ninguna diferencia. De igual forma la aptitud de los animales no se relacionó con la diferente proporción de reactores detectados con los distintos puntos de corte.

El grado de acuerdo obtenido entre los distintos criterios analizados se muestra en la Tabla 9. Sobre el total de muestras evaluadas ($n=66.410$), la concordancia obtenida osciló entre 0,46 y 0,99 (moderada y prácticamente excelente) con todos los puntos de corte evaluados, obteniéndose los valores más elevados en el ganado de lidia. La concordancia entre C7 y C8 y el resto de criterios se calculó únicamente con las muestras procedentes de la CAM ($n=9.744$). El valor obtenido al comparar el C7 con el C1 y el C2 fue excelente ($k=0,97$ y $k=0,87$) respectivamente), mientras que al comparar el C7 con los criterios C3-C6 el grado de acuerdo obtenido fue bueno ($k<0,68$). La concordancia alcanzada con el C8 y los criterios C1-C6 fue moderada-buena en todos los casos ($k>0,77$).

Tabla 9. Concordancia (estadístico kappa) obtenida al comparar los resultados del test de detección de IFN- γ con las muestras procedentes de explotaciones infectadas (1, $n=66.410$), y sobre las muestras de los animales infectados (2, $n=919$) con los distintos puntos de corte evaluados.

| Aptitud | | C1 | | C2 | | C3 | | C4 | | C5 | |
|---------|--------------------|----------------|----------------|------|------|------|------|------|------|----|------|
| | | 1 ¹ | 2 ² | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| C2 | Carne | 0,76 | 0,47 | | | | | | | | |
| | Leche ⁴ | 0,78 | 0,81 | | | | | | | | |
| | Lidia ⁵ | 0,81 | 0,47 | | | | | | | | |
| | Total ⁶ | 0,78 | 0,51 | | | | | | | | |
| C3 | Carne | 0,50 | 0,30 | 0,69 | 0,73 | | | | | | |
| | Leche | 0,46 | 0,46 | 0,63 | 0,61 | | | | | | |
| | Lidia | 0,67 | 0,30 | 0,85 | 0,73 | | | | | | |
| | Total | 0,55 | 0,32 | 0,74 | 0,73 | | | | | | |
| C4 | Carne | 0,50 | 0,30 | 0,71 | 0,73 | 0,97 | 1 | | | | |
| | Leche | 0,46 | 0,46 | 0,64 | 0,61 | 0,98 | 1 | | | | |
| | Lidia | 0,67 | 0,30 | 0,85 | 0,73 | 0,99 | 1 | | | | |
| | Total | 0,55 | 0,33 | 0,75 | 0,73 | 0,98 | 1 | | | | |
| C5 | Carne | 0,50 | 0,30 | 0,71 | 0,73 | 0,97 | 1 | 1 | 1 | | |
| | Leche | 0,46 | 0,46 | 0,64 | 0,61 | 0,98 | 1 | 1 | 1 | | |
| | Lidia | 0,67 | 0,30 | 0,85 | 0,73 | 0,99 | 1 | 0,99 | 1 | | |
| | Total | 0,55 | 0,33 | 0,75 | 0,73 | 0,98 | 1 | 1 | 1 | | |
| C6 | Carne | 0,50 | 0,30 | 0,71 | 0,73 | 0,97 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Leche | 0,46 | 0,46 | 0,64 | 0,61 | 0,98 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Lidia | 0,68 | 0,31 | 0,86 | 0,74 | 0,99 | 0,99 | 1 | 0,99 | 1 | 0,99 |
| | Total | 0,56 | 0,33 | 0,75 | 0,74 | 0,98 | 0,99 | 1 | 1 | 1 | 1 |

¹Muestras de explotaciones infectadas ($n=66.410$); ²Muestras de los animales infectados ($n=919$).

Muestras procedentes de animales infectados

Al estudiar la proporción de animales en los que se confirmó la infección ($n=919$), la concordancia observada entre C1 y C2 (y entre cualquiera de ellos comparado con los criterios C3-C6) fue similar. Al analizar el grado de acuerdo alcanzado sobre el total de muestras

analizadas comparado con aquellas obtenidas de animales infectados en función de la aptitud, el ganado de leche mostró siempre una concordancia similar entre los dos grupos de muestras, o superior en el caso de aquellas procedentes de animales en los que se confirmó la infección. Sin embargo, en carne y lidia, la concordancia fue superior al el total de muestras analizadas, siendo significativamente inferior ($p<0,05$) sobre aquellas procedentes de animales en los que se confirmó la infección (Tabla 9).

En el grupo de animales en los que se confirmó la infección se observó una concordancia limitada entre el C1 y los demás criterios evaluados debido a que hubo una elevada proporción de animales infectados clasificados correctamente (detectados) con el C1 y que fueron negativos al usar C2 y C3-C6 (test de McNemar, $p<0,05$). Lo mismo ocurrió al comparar el C2 con los criterios C3-C6 (test de McNemar, $p<0,05$, Tabla 10). La comparación de los criterios C1-C6 con C7 y C8 se vio sesgada por el limitado número de animales infectados analizados con el C7 y el C8 ($n=216$). En cualquier caso, el uso de C7 dio lugar a resultados similares al C1 (test de McNemar, $p=0,25$) y significativamente superiores que el C2 y el C3-C6 ($p<0,05$), mientras que el C8 detectó una proporción significativamente menor de animales infectados que el C1 ($p<0,05$) pero similar al C2 ($p=1,0$) y más elevada que C3-C6 ($p<0,05$).

Tabla 10. Resultados obtenidos en los animales con infección confirmada de Castilla y León y la CAM empleando el C1, C2 y C3 en la interpretación del test de detección de IFN- γ .

| C1 | C2 | | C3 | | Total |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 658 | 152 | 544 | 266 | 819 |
| Negativo | 0 | 109 | 1 | 108 | 109 |
| Total | 658 | 261 | 545 | 374 | 919 |

El análisis multivariable, realizado con los datos de los animales procedentes de las explotaciones infectadas de Castilla y León ($n=598$), se realizó comparando el efecto del uso de los criterios C1, C2 y C3, dado que los resultados obtenidos en este grupo de muestras con los criterios C4-C6 fueron virtualmente idénticos a los observados usando el C3. Los modelos finales incluyeron dos variables independientemente de la variable respuesta analizada: la edad y el número de saneamientos previos realizados en la explotación desde el inicio del brote. Las áreas bajo las curvas ROC fueron al menos 0,75 para los dos modelos, sugiriendo que ambos tenían una capacidad predictiva adecuada.

La edad (categorizada en cuartiles) se asoció con un mayor riesgo de clasificar como negativos animales infectados (y detectados con C1) con los criterios C2 y C3 (Tabla 11). La probabilidad de ser un falso negativo aplicando los criterios C3-C6 fue significativamente mayor en animales mayores de 3,2 años (OR=2,25, IC 95%, 1,20-4,23), mientras que al aplicar el criterio C2 la significación estadística solo se observó en animales superiores a 10,6 años (OR=2,65, IC 95%, 1,55-4,54).

El número de saneamientos previos realizados desde el comienzo del brote en la explotación también se asoció con un mayor riesgo de clasificar incorrectamente animales infectados cuando se emplearon criterios distintos del C1. Al emplear el C2, la probabilidad de no detectar animales infectados (que se clasificarían adecuadamente empleando el C1) fue significativamente superior en el tercer muestreo realizado tras el inicio del brote (OR=3,22, IC 95%, 1,41-7,36).

Asimismo, la significación de esta asociación también se observó al comparar el C1 y los criterios C3-C6. Animales infectados clasificados como positivos con el C1 se identificarían como negativos con los criterios C3-C6 ya en el segundo (OR=1,93, IC 95%, 1,09-3,42) tercer (OR=3,75, IC 95%, CI 1,73- 8,15) y cuarto saneamiento realizado (OR=2,81, IC 95%, 1,32-6,01) tras el inicio del brote (Tabla 11).

Tabla 11. Probabilidad estimada, IC 95% y P-valores de los *odds ratios* (OR) ajustados para los animales infectados (n=598) procedentes de Castilla y León detectados por el C1 y clasificados como negativos por el C2 y el C3 sobre, empleando un modelo multivariable mixto de regresión logística.

| | Variable | Categoría | N | Animales no detectados | OR (IC 95%) | P |
|---------------------|---------------------------|----------------|-----|------------------------|------------------|--------|
| C1+C2- ¹ | Edad ³ (años) | 1Q (0,5-3,2) | 150 | 23 (15,3%) | 1 | NA |
| | | 2Q (>3,2-6,6) | 149 | 32 (21,5%) | 1,55 (0,81-2,96) | 0,18 |
| | | 3Q (>6,6-10,6) | 149 | 38 (25,5%) | 1,90 (0,99-3,62) | 0,05 |
| | | 4Q (>10,6-28) | 150 | 41 (27,3%) | 2,25 (1,20-4,23) | 0,01 |
| | Saneamientos ⁴ | 1 | 406 | 84 (20,7%) | 1 | NA |
| | | 2 | 99 | 24 (24,2%) | 1,89 (0,98-3,64) | 0,06 |
| | | 3 | 37 | 12 (32,4%) | 3,22 (1,41-7,36) | 0,006 |
| | | ≥4 | 56 | 14 (25,0%) | 2,25 (0,96-5,29) | 0,06 |
| C1+C3- ² | Edad (años) | 1Q (0,5-3,2) | 150 | 36 (24,0%) | 1 | NA |
| | | 2Q (>3,2-6,6) | 149 | 64 (43,0%) | 2,65 (1,55-4,54) | <0,001 |
| | | 3Q (>6,6-10,6) | 149 | 71 (47,7%) | 3,14 (1,82-5,42) | <0,001 |
| | | 4Q (>10,6-28) | 150 | 64 (42,7%) | 2,67 (1,56-4,58) | <0,001 |
| | Saneamientos | 1 | 406 | 147 (36,2%) | 1 | NA |
| | | 2 | 99 | 40 (40,4%) | 1,93 (1,09-3,42) | 0,02 |
| | | 3 | 37 | 20 (54,1%) | 3,75 (1,73-8,15) | <0,001 |
| | | ≥4 | 56 | 28 (50,0%) | 2,81 (1,32-6,01) | 0,007 |

¹Animales infectados detectados por el C1 y no por el C2; ²Animales infectados detectados por el C1 y no por el C3; ³Edad categorizada en cuartiles; ⁴Saneamientos realizados desde el comienzo del brote.

Sensibilidad relativa combinada, especificidad y estimaciones de la semisuma de la sensibilidad-especificidad

Tal y como ocurre con otras pruebas diagnósticas, cuando se maximiza el número de animales infectados detectados la especificidad del test se ve reducida (Figura 15 A y B). La máxima sensibilidad relativa se obtuvo cuando el valor del punto de corte A (valor de DO obtenido por la PPD bovina en relación al del PBS) y el valor del punto de corte B (valor de DO de la PPD bovina en relación al obtenido con la PPD aviar) fueron <0,1 (Figura 15A),

mientras que el valor máximo de especificidad se obtuvo con cuando el valor del punto de corte A osciló entre 0-0,1 y el valor del punto de corte B varió entre 0-0,025 (Figura 15B).

Cuando el punto de corte A oscila entre 0,05 y 0,1 la especificidad del test se incrementa aunque el punto de corte B se mantenga próximo a 0 (Figura 15B). Asimismo, cuando la interpretación del test de detección de IFN- γ se basa únicamente en el punto de corte B se garantiza una elevada especificidad del mismo (superior al 98%) siempre este sea $>0,05$ (por ejemplo el C3 fue el criterio más específico y su punto de corte B es $\geq 0,1$) a pesar de que se limita severamente la capacidad de detectar animales infectados (Figura 15 A).

La semisuma de los valores obtenidos para la sensibilidad y especificidad se maximizó (superior al 90%) cuando los puntos de corte A y B se establecieron entre 0,0125-0,05 y 0-0,025, respectivamente (Figura 15C).

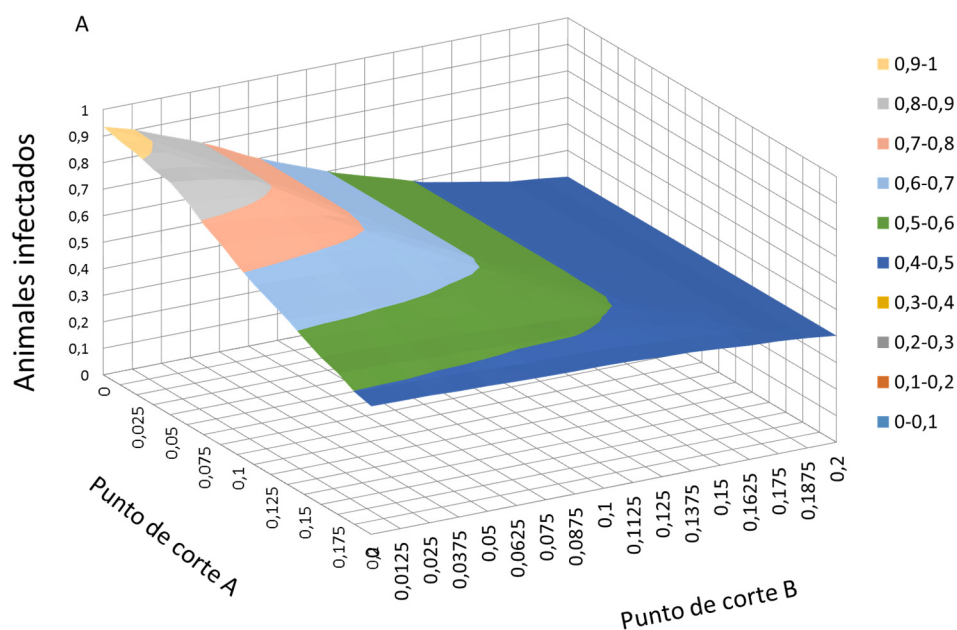


Figura 15A. Sensibilidad relativa sobre los animales procedentes de explotaciones infectadas en los que se confirmó la infección en función del valor establecido para el punto de corte A ($DO\ PPD_{bDO} - DO\ PBS_{DO}$) y el punto de corte B ($DO\ PPD_{bDO} - DO\ PPD_{aDO}$).

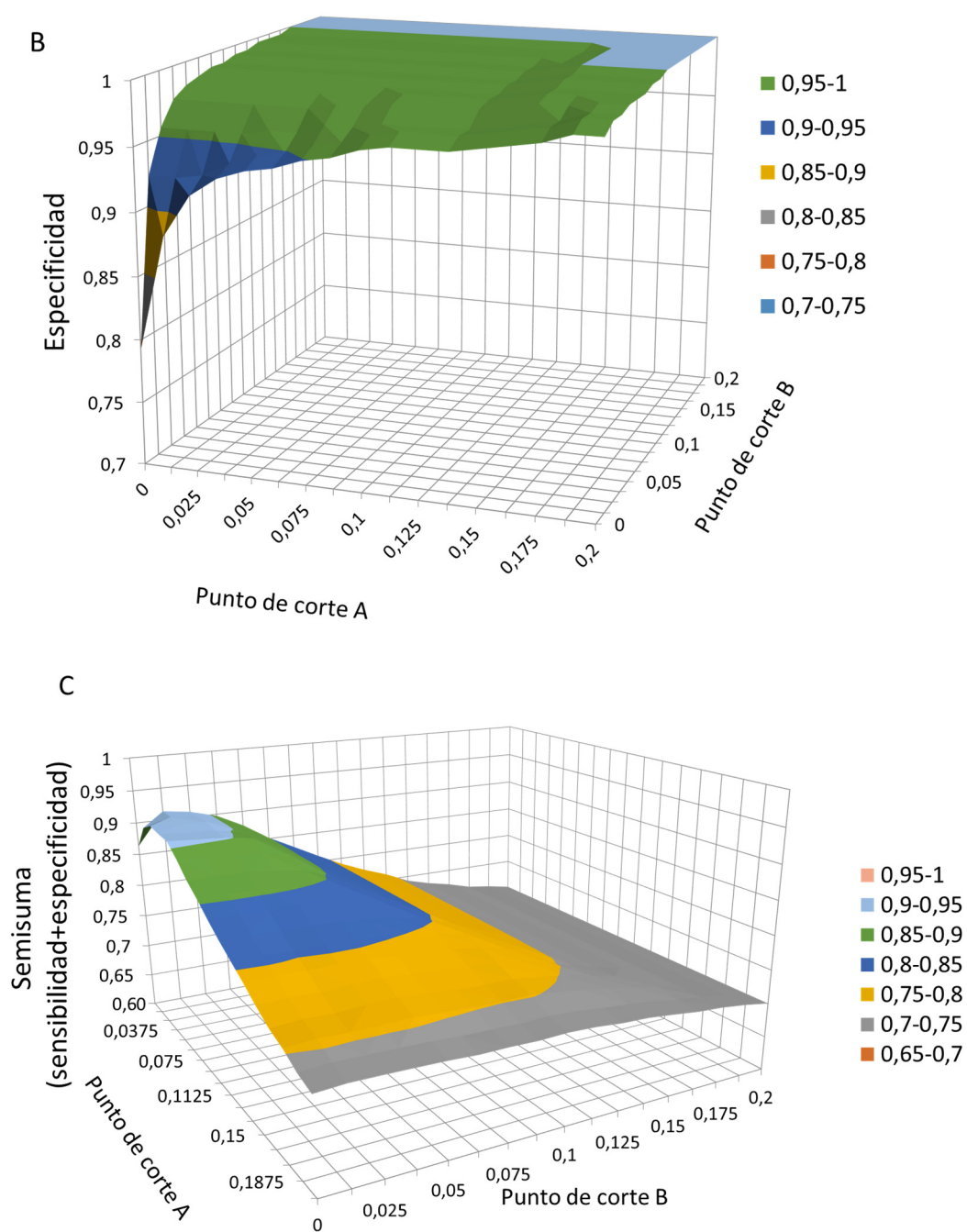


Figura 15B y 15C. Especificidad sobre los animales procedentes de explotaciones OTF calificadas (Figura 15B), y semisuma (Figura 15C) en función del valor establecido para el punto de corte A (DO PPD_{bDO} – DO PBS_{DO}) y el punto de corte B (DO PPD_{bDO} – DO PPD_{aDO}).

3.1.2.3. Resumen

Los resultados obtenidos en el segundo estudio experimental ponen de manifiesto que existen diferencias significativas en la proporción de animales detectados en función del punto de corte establecido para la interpretación del test de detección de IFN- γ realizado con el Kit Bovigam en situaciones de ausencia y presencia de enfermedad. En explotaciones infectadas la elección de un punto de corte menos estricto supondría la clasificación incorrecta de una proporción variable de animales infectados, habiéndose observado además que existen otros factores (como la edad y el número de muestreos previos realizados en la explotación) que pueden influir en el rendimiento del punto de corte seleccionado.

3.1.3. Tercer estudio experimental: comparación de varios kits comerciales en el resultado del test de detección de IFN- γ sobre muestras de ganado bovino procedentes de explotaciones infectadas de forma natural

El tercer estudio experimental se diseñó para analizar y comparar el resultado obtenido con distintos kits comerciales de detección de IFN- γ en muestras de plasma de ganado bovino procedente de explotaciones infectadas de forma natural. La finalidad de este estudio fue poner de manifiesto la posible variabilidad observada en el resultado del test de detección de IFN- γ debida al propio modelo de ELISA empleado y a la interpretación de los resultados. También se compararon los resultados con los obtenidos en la IDTB simple, y se evaluaron las diferencias cuantitativas (DO) entre los distintos kits evaluados. Hasta la fecha no existía información publicada sobre el efecto del kit comercial en el rendimiento del test de detección de IFN- γ , fundamentalmente porque uno de los kits disponibles en el mercado [el kit Bovigam (*Thermo Fisher Scientific, USA*)] ha sido empleado en una gran mayoría de los programas y ensayos en el pasado. Esta situación está cambiando, ya que actualmente hay varios países que están evaluando el empleo de otros kits comerciales. **Este tercer estudio experimental se enmarca dentro del capítulo I.**

3.1.3.1. Material y métodos

3.1.3.1.1. Población en estudio

Para la realización de este trabajo se utilizaron un total de 596 muestras de plasma procedentes de explotaciones en las que previamente se había confirmado la infección y que estaban situadas en la zona centro de España (CAM y Castilla la Mancha). Todas las muestras seleccionadas forman parte del banco de plasmas del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET, España) y fueron recogidas en el marco del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina.

Según la normativa nacional (MAGRAMA, 2015), las explotaciones infectadas se sanean cada 2-6 meses. De acuerdo a la legislación nacional y Europea, todos los animales mayores de 6 semanas se someten a la IDTB cervical, y a los mayores de 6 meses se les recoge una muestra de sangre para realizar el test de detección de IFN- γ , además se respetó un periodo mínimo de 60 días entre la última IDTB y el muestreo realizado para el estudio. Aquellos animales positivos a una u otra prueba diagnóstica son considerados positivos y se sacrifican en un plazo de 15 días tras la realización de las mismas, analizándose posteriormente en el matadero para detectar la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis y proceder a la toma de muestras para la realización del cultivo microbiológico (primer estudio experimental).

Para la realización del estudio, de entre todas las muestras disponibles en el panel de VISAVET, se realizó una selección aleatoria de aquellas muestras de plasma de animales en los que se había confirmado la infección (cultivo microbiológico positivo y/o presencia de lesiones compatibles) y que habían sido positivos a la IDTB simple efectuada en la zona cervical y/o al test de detección de IFN- γ (realizado con el kit Bovigam) en distintos saneamientos dentro del marco del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina. Para la selección también se tuvo en cuenta que se dispusiera de volumen suficiente para realizar los distintos ELISAs en paralelo. Todas las muestras seleccionadas habían sido analizadas mediante el test de IFN- γ en los cuatro años anteriores al estudio. Debido a cuestiones logísticas relacionadas con la disponibilidad de los kits este estudio se realizó en tres fases en los años 2012, 2013 y 2015, analizándose en cada año un panel distinto de muestras (Tabla 12).

Tabla 12. Número de muestras y momento de recogida de las mismas, explotaciones seleccionadas, rango de animales incluidos en cada una (mínimo y máximo), prevalencia de tuberculosis y número de animales sacrificados/con infección confirmada.

| | Primer panel | Segundo panel | Tercer panel |
|------------------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Muestras (n) | 95 | 224 | 277 |
| Explotaciones (n) | 12 | 54 | 5 |
| Recogida de las muestras (año) | 2008, 2010-2012 | 2010-2011 | 2010, 2012-2013 |
| Rango animales/explotación | 1-22 | 1-22 | 13-139 |
| % reactores¹ | 0-100% | 0-100% | 7,9-48,2% |
| Sacrificio | 95 | 224 | 274 |
| TBC² | 35 | 72 | 71 |
| Kits evaluados | kit Bovigam | kit Bovigam | kit Bovigam |
| | kit B | - | - |
| | kit C | kit C | kit C |
| Realización de los ELISAs (año/estudio) | 2012 | 2013 | 2015 |

¹Reactores (rango mínimo-máximo) obtenidos en el momento de recoger las muestras de plasma; la IDTB cervical se realizó con la PPD bovina (1 mg/ml, 2.500 IU, CZ Veterinaria, España, primer estudio experimental), se aplicó la interpretación severa de la IDTB cervical (Anexo I); ²Animales en los que se confirmó la infección tuberculosa (cultivo microbiológico positivo y/o presencia de lesiones compatibles con la enfermedad).

En el segundo panel, además de elegir animales en los que se confirmó la infección, de forma aleatoria se seleccionaron distintas muestras en función al valor de DO obtenido en el pocillo estimulado con PPD bovina en el kit Bovigam, realizado en los cuatro años anteriores al estudio dentro del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina (Tabla 13).

Tabla 13. Segundo panel de muestras seleccionadas (n=224). Los grupos se establecieron en función del valor de DO obtenido previamente con el kit Bovigam.

| GRUPOS | G1 | G2 | G3 | G4 | Total |
|------------------|-------|----------|---------|------|-------|
| Muestras (n) | 37 | 73 | 58 | 56 | 224 |
| DO ¹ | <0,05 | 0,05–0,1 | 0,1–0,5 | >0,5 | - |
| TBC ² | 1 | 20 | 17 | 34 | 72 |

¹DO del pocillo estimulado con la PPD bovina obtenido con el kit Bovigam; ²Muestras en las que se confirmó la infección (presencia de lesiones y/o cultivo microbiológico positivo).

Por último, en el tercer panel de muestras de este estudio se incluyeron tres explotaciones (n=238) en las que tras finalizar el muestreo pertinente desarrollado según la normativa nacional, se aplicó un vacío sanitario, debido a la infección crónica de tuberculosis existente.

3.1.3.1.2. Diseño experimental

Para evaluar el efecto del kit comercial en el resultado del test de detección de IFN- γ , en el presente trabajo se incluyó el kit Bovigam y dos kits alternativos (B y C). En todas las muestras evaluadas (596) se disponía del resultado de la IDTB cervical realizada en el momento de la extracción de las mismas, así como del resultado microbiológico de los animales sacrificados. Por motivos relacionados con la confidencialidad de los resultados, los nombres de los kits empleados aparecen codificados excepto el kit Bovigam, ya que fue el empleado de acuerdo a la normativa nacional (MAGRAMA, 2015) para el desarrollo de este estudio.

Test de detección de IFN- γ

Cuando se efectuó la extracción de sangre previa realización de la IDTB se emplearon tubos con heparina de litio, y posteriormente las muestras se trasladaron en las siguientes 8 horas a un laboratorio autorizado en cada Comunidad Autónoma para la realización de la estimulación de las muestras empleando las PPDs de rutina (CZ Veterinaria, España) y la recogida del plasma (protocolo descrito según el segundo estudio experimental). Tras la realización del test de detección de IFN- γ con el kit Bovigam las muestras permanecieron congeladas a -20°C hasta realizar el presente trabajo.

Una vez seleccionadas las muestras en función de los criterios previamente descritos se siguieron las instrucciones detalladas de cada fabricante en la realización del protocolo e

interpretación de los resultados (ver más adelante). Para evitar ciclos de congelación-descongelación que pudieran afectar a los resultados, todos los ELISAs se realizaron en paralelo.

Los tres kits incluidos se basan en el mismo principio, el análisis de las muestras estimuladas en placas tapizadas con Ac específicos anti-IFN- γ de ganado bovino, por lo que si esta citoquina está presente en la muestra se fija a los Ac; posteriormente, el IFN- γ presente en las muestras es detectado mediante la adición de un segundo Ac anti-IFN- γ unido a una enzima que está marcada para que en presencia de un sustrato produzca una reacción que permita detectar la presencia del IFN- γ en la muestra. Sin embargo, los kits difieren en cuanto a varios aspectos de su protocolo (dilución de las muestras, controles incluidos para validar los resultados obtenidos, etc.) y la interpretación de sus resultados. La Tabla 14 recoge las diferencias existentes entre los protocolos de los tres kits evaluados.

En el caso del kit B, las placas se deben tapizar antes de realizar en ELISA (en el presente estudio se tapizaron la noche anterior) y, al no especificar ninguna dilución de la muestra de partida, se empleó la misma que para los otros kits evaluados (1:2). Para la interpretación de los resultados en este caso fue necesario elaborar una curva patrón para cada placa con los valores de DO obtenidos en 9 diluciones de un IFN- γ bovino recombinante (facilitado por el fabricante) que se emplea como estándar, incluidas por duplicado.

Tabla 14. Diferencias en los protocolos e interpretación de los resultados de los tres kits para la detección de IFN- γ .

| | kit Bovigam¹ | kit B | kit C |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| Placas tapizadas previamente | Si | No | Si |
| Dilución | 1:2 | No especificada | 1:2 |
| Controles | 3 CN ² y 3 CP ² | - | 2 CN y 2 CP |
| Interpretación de resultados | DO PPD bovina – DO PBS $\geq 0,05$ DO PPD bovina > DO PPD aviar | curva patrón | <i>sample/positive (S/P) ratio</i> |
| Muestras analizadas | Tres paneles (n=596) | Primer panel (n=95) | Tres paneles (n=596) |

¹Su protocolo de realización e interpretación se han descrito anteriormente (segundo estudio experimental, criterio C1 y Anexo I); ²CN: control negativo; CP: control positivo.

En el kit C el resultado, el cociente S/P, se obtuvo a partir de los valores de DO obtenidos con las muestras analizadas y la media de los controles positivos y negativos de cada placa. El *ratio* S/P se calcula a partir de la “muestra activada” (estimulada con PPD bovina), una “muestra control” (estimulada con PPD aviar), y los valores de los controles negativos y positivos de cada placa, según la ecuación:

$$S/P = \frac{DO \text{ muestra activada} - DO \text{ valor muestra control}}{DO \text{ media controles positivos} - DO \text{ media controles negativos}} \times 100$$

A lo largo del estudio, el fabricante modificó el punto de corte del kit C:

- en el primer y el segundo panel (n=319) una muestra fue positiva cuando el S/P fue igual o superior a 40%.
- en el tercer panel de muestras (n=277) una muestra se consideró positiva cuando el valor S/P fue igual o superior a 35%.

Con el fin de estandarizar los resultados obtenidos con los distintos kits evaluados, los resultados de los kits B y C se analizaron también empleando el criterio especificado para el kit Bovigam. Este criterio alternativo se presenta a continuación como kit B/2 y kit C/2 cuando fue empleado en la interpretación del kit B y C, respectivamente. En el caso del kit C se evaluó también el efecto de utilizar como “muestra control” aquella estimulada con PBS (en lugar de la estimulada con PPD aviar, según recomienda el fabricante), denominándolo criterio 3 (kit C/3).

3.1.3.1.3. Análisis estadístico

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con los distintos kits evaluados se empleó el test Chi-cuadrado de Pearson. Para realizar el análisis de los datos cualitativos de muestras pareadas para más de dos categorías se empleó el test Q de Cochran, y en aquellos casos en los que se observaron diferencias significativas, se empleó además el test de McNemar para muestras pareadas para dos categorías. Los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron mediante el método de Wilson, y la correlación entre los resultados se calculó utilizando el coeficiente de Spearman (ρ), analizando los datos con el programa *Win Pepi* [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35]. Además se usó el coeficiente kappa (k) para valorar el grado de acuerdo en los resultados obtenidos empleando los distintos kits comerciales y la IDTB.

Las diferencias en las proporciones de reactores en función del punto de corte se evaluaron sobre el total de animales analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección en el post-mortem. No obstante, y debido al limitado número de animales en los que se confirmó la infección, y a que se sacrificó solo una pequeña proporción de animales negativos, los resultados obtenidos se emplearon para calcular la proporción de animales positivos a cada test diagnóstico (T+) sobre aquellos en los que se confirmó la infección (cultivo positivo y/o presencia de lesiones compatibles, C+), denominándolo valor T+/C+, en lugar de estimar directamente la sensibilidad (si bien el T+/C+ se relacionaría directamente con ésta).

Para analizar la posible diferencia entre la DO (valor cuantitativo) obtenida analizando las muestras estimuladas con los distintos antígenos (PBS, PPD aviar y PPD bovina) se comprobó la normalidad de los datos empleando el test Kolmogorov-Smirnov. En función de

los resultados en dicha prueba la relación entre el kit empleado y los resultados cuantitativos se analizó mediante pruebas paramétricas (test t de Student, ANOVA para muestras pareadas) y no paramétricas (test de Wilcoxon, test de Friedman).

3.1.3.2. Resultados

Resultados obtenidos en cada panel de muestras

El **primer panel de muestras** (n=95), se analizó con los tres kits comerciales. Finalizado el muestreo, todos los animales se sacrificaron y se procedió a la realización del cultivo microbiológico, confirmándose la infección (presencia de lesiones compatibles y/o cultivo positivo) en 35 de ellos. La proporción de reactores sobre el total de analizados y sobre los animales infectados (T+/C+) del primer panel se detalla en la Tabla 15. La IDTB simple realizada en la región cervical identificó una proporción de animales significativamente menor (test de McNemar, $p<0,05$) que los kits evaluados (sobre el total de muestras y sobre aquellas en las que se confirmó la infección), y la concordancia obtenida al comparar la IDTB con todos los kits analizados fue siempre negativa (oscilando el valor de $kappa$ entre -0,26 y -0,04).

Al emplear las instrucciones recomendadas por el fabricante, el kit Bovigam detectó la mayor proporción de reactores (80/95, 84,2%), seguido del kit B/1 (53/95 55,8%) y kit C/1 (42/95 44,2%). Se observaron diferencias significativas (test de McNemar, $p<0,001$) en la proporción de reactores detectados mediante el kit Bovigam y el kit B/1 y kit C/1, y entre el kit B/1 y el kit C/1, (test de McNemar, $p=0,03$) (Tabla 15). En el kit B, la proporción de reactores detectados con el criterio alternativo (B/2) fue significativamente superior (66,3% frente a 55,8%) a la alcanzada con el B/1 (test de McNemar, $p<0,05$). De igual forma, el uso del criterio alternativo C/2 en la interpretación de los resultados del kit C también dio lugar a la mayor proporción de reactores (Tabla 15), siendo ésta significativamente superior que al aplicar el criterio recomendado por el fabricante (kit C/1). El grado de acuerdo alcanzado al comparar el kit Bovigam con los demás fue limitado-moderado ($k=0,13-0,52$), siendo más elevado al comparar el kit B/1 con el kit C/2.

El patrón observado sobre los animales infectados fue similar, ya que siguiendo las instrucciones del fabricante el valor T+/C+ más elevado se obtuvo con el kit Bovigam (33/35 94,3%), pero seguido en esta ocasión del kit C/1 (27/35 77,1%), siendo por tanto el kit B/1 el que alcanzó el menor valor T+/C+ (26/35 74,3%) (Tabla 15), y detectándose diferencias significativas (test de McNemar, $p<0,001$) entre el kit Bovigam y los kits B/1 y kit C/1. Con los criterios alternativos, de nuevo el kit B/2 alcanzó un rendimiento superior al del kit B/1, ya que el kit B/2 detectó tres animales infectados adicionales.

Tabla 15. Reactores obtenidos sobre el total de animales analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección (T+/C+) del primer panel de muestras.

| | | | Reactores (n=95) | T+/C+ (n=35) |
|----------------|--------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Técnica | IDTB* | | 27; 28,4% (20,3-38,2) ⁴ | 9; 25,7% (14,2-42,1) |
| | kit Bovigam | | 80; 84,2% (75,6-90,2) | 33; 94,3% (81,4-98,4) |
| | kit B | kit B/1 ¹ | 53; 55,8% (45,8-65,4) | 26; 74,3% (57,9-85,8) |
| | | kit B/2 ² | 63; 66,3% (56,3-75,0) | 29; 82,9% (67,3-91,9) |
| | kit C S/P≥40% | kit C/1 ¹ | 42; 44,2% (34,6-54,2) | 27; 77,1% (61,0-87,9) |
| | | kit C/2 ² | 68; 71,6% (61,8-79,7) | 32; 91,4% (77,6-97,0) |
| | | kit C/3 ³ | 60; 63,2% (53,1-72,2) | 32; 91,4% (77,6-97,0) |

*IDTB: prueba simple realizada en la zona cervical, interpretación severa; ¹Interpretación realizada según el fabricante; ²Interpretación del kit Bovigam; ³Interpretación considerando como "muestra control" aquella estimulada con el PBS; ⁴IC Wilson, 95%.

Con el kit C, los dos criterios alternativos evaluados (C/2 y C/3) detectaron la misma proporción de animales infectados (32/35 91,4%), siendo ésta superior a la obtenida con el kit C/1 (Tabla 15). La concordancia del kit Bovigam con el resto de kits fue más variable que sobre el total de muestras analizadas ($k=-0,07-0,79$). Al comparar el kit B/2 y el kit C/2 el grado de acuerdo alcanzado fue superior que con el resto de criterios evaluados.

El **segundo panel de muestras** (n=224), se analizó con el kit Bovigam y el kit C. Todos los animales se sacrificaron y se procedió a la realización del cultivo microbiológico, confirmándose la infección (presencia de lesiones compatibles y/o cultivo positivo) en 72 de ellos (1, 20, 17 y 34, respectivamente, en los grupos 1, 2, 3 y 4). La proporción de reactores sobre el total de muestras analizadas y sobre los animales infectados (T+/C+) del segundo panel se detalla en la Tabla 16.

En el grupo 1 (n=37, valor de $DO<0,05$), debido al propio criterio de selección de las muestras incluidas, la IDTB fue la prueba que detectó la mayor proporción de animales (78,4%, IC 95%, 62,8-88,6). El rendimiento obtenido entre los dos kits evaluados y los distintos criterios fue muy similar, hallándose únicamente un animal de diferencia entre el kit Bovigam y el kit C/1 y el kit C/3. Únicamente con el kit C/2 se detectó una diferencia de seis animales con el resto de kits, obteniendo por tanto el mayor valor T+/C+ (Tabla 16). Al comparar los resultados de los distintos ELISAs/interpretaciones, la concordancia alcanzada fue pobre ($k<0,20$) en todos los casos.

Tabla 16. Reactores (R) obtenidos sobre el total de analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección (T+/C+) en el segundo panel (grupos 1, 2 y 3) del tercer estudio experimental. Las muestras se clasificaron en función del valor de DO obtenido en el ELISA realizado con el kit Bovigam.

| DO Kit Bovigam | | G1 DO<0,05 | G2 0,05<DO<0,1 | | G3 0,1<DO<0,5 | | G4 DO>0,5 | |
|----------------|----------------------|-------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | R (n=37) | R (n=73) | T+/C+ (n=20) | R (n=58) | T+/C+ (n=17) | R (n=56) | T+/C+ (n=34) |
| Técnica | IDTB * | 29; 78,4% (62,8-88,6) ⁴ | 12; 16,4% (9,7-26,6) | 3; 15,0% (5,2-36,0) | 7; 12,3% ⁵ (6,1-23,3) | 3; 17,7% (6,2-41,0) | 26; 46,4% (34,0-59,3) | 19; 55,9% (39,5-71,1) |
| | kit Bovigam | 2; 5,4% ⁵ (1,5-17,7) ⁵ | 39; 53,4% (42,1-64,5) | 17; 85,0% (64,0-94,8) | 53; 91,4% (81,4-96,3) | 17; 100% (81,6-100) | 53; 94,6% (85,4-98,2) | 32; 94,2% (80,9-98,4) |
| | kit C/1 ¹ | 1 ^{**} ; 2,7% (80,1-13,8) | 5; 6,9% (3,00-15,1) | 3; 15,0% (5,2-36,0) | 30; 51,7% (39,2-64,1) | 15; 88,2% (65,7-96,7) | 44; 78,6% (66,2-87,3) | 30; 88,2% (73,4-95,3) |
| | kit C/2 ² | 7 ^{**} ; 18,9% (9,5-34,2) | 43; 58,9% (47,5-69,5) | 17; 85,0% (64,0-94,8) | 53; 91,4% (81,4-96,3) | 17; 100% (81,6-100) | 54; 96,4% (87,9-99,0) | 33; 97,1% (85,1-99,5) |
| | kit C/3 ³ | 1 ^{**} ; 2,7% (80,1-13,8) | 13; 17,8% (10,7-28,1) | 8; 40,0% (21,9-61,3) | 51; 87,9% (77,1-94,0) | 16; 94,1% (73,0-99,0) | 52; 92,9% (83,0-97,2) | 33; 97,1% (85,1-99,5) |

*IDTB: IDTB simple realizada en la zona cervical, interpretación severa; ¹Interpretación según el fabricante; ²Interpretación del kit Bovigam; ³Interpretación considerando como "muestra control" aquella estimulada con el PBS; ⁴IC Wilson, 95%; ⁵En un animal no se pudo realizar la IDTB simple; ⁵Al repetir el ELISA dos muestras fueron positivas con el kit Bovigam, realizado en paralelo con el kit C; ** animal en el que se confirmó la infección del G1.

En el grupo 2 (n=73, valor de $0,05 < DO < 0,1$), las diferencias entre los kits/interpretaciones fueron más acusadas entre el kit C/2 y el kit Bovigam. El mayor número de reactores sobre el total se obtuvo con el kit C/2, mientras que el valor T+/C+ más elevado se alcanzó tanto con el kit Bovigam como con el kit C/2 (Tabla 16). El uso del kit C/1 y kit C/3 resultó en un número significativamente menor de reactores en el total y sobre los animales infectados (Tabla 16).

En el grupo 3 (n=58, valor de $0,1 < DO < 0,5$), los resultados fueron muy similares, con un rendimiento equivalente de los kits Bovigam, kit C/2 y kit C/3 en el total de animales y en los T+/C+, y un número de reactores significativamente menor (McNemar, $p < 0,05$) en el C/1 sobre el total de los animales (mientras que no existieron diferencias significativas en los T+/C+). El grado de acuerdo entre la IDTB y los ELISAs realizados fue limitado ($k < 0,10$), y la máxima concordancia ($k = 1,00$) se alcanzó al comparar el kit Bovigam con el kit C/2.

Por último, en el grupo 4 (n=56, valor de $DO > 0,5$), se obtuvieron resultados muy similares independientemente del kit/interpretación tanto en el total de animales como en los T+/C+, con diferencias de no más de 3 animales entre los kits (Tabla 16) excepto en el caso del kit C/1, que ofreció un rendimiento menor en el total de animales (pero similar en los T+/C+).

En total, si bien los resultados entre todos los kits (excepto el kit C/1) fueron muy similares en el caso de muestras con valores elevados de IFN- γ (grupos 3 y 4), al analizar muestras más próximas a los valores de corte la concordancia fue disminuyendo; en cualquier

caso el kit C/2 ofreció un rendimiento similar al Bovigam en los animales T+/C+ en todo momento (Tabla 16). La mayor proporción de animales reactivos con el kit C se obtuvo en todos los casos aplicando interpretaciones alternativas a la recomendada por el fabricante, detectándose siempre un mayor número de animales positivos y un valor T+/C+ más elevado al emplear el kit C/2 seguido del kit C/3.

Siguiendo la recomendación del fabricante, en nueve muestras del segundo panel, en las que la DO obtenida en el pocillo estimulado con la PPD aviar (kit Bovigam realizado antes del presente estudio) fue superior a 0,1, se empleó además la dilución 1:10 con un punto de corte que consideró un animal positivo cuando el S/P fue igual o superior a 20%. Con esta dilución alternativa, y siguiendo la interpretación recomendada por el fabricante, se detectaron seis animales más que con la dilución 1:2 [22,2% (IC 95%, 6,3-54,7) frente a 88,9% (IC 95%, 56,5-98,0)], siendo los resultados idénticos a los obtenidos con el Bovigam (y superiores si se considera el valor T+/C+, ya que se detectaron los cuatro animales infectados, frente a los tres detectados utilizando el kit Bovigam).

El tercer panel de muestras (n=277), se analizó con dos kits comerciales (kit Bovigam y kit C, utilizando un punto de corte distinto al usado en el segundo panel). Finalizado el muestreo, salvo tres animales que murieron por causas naturales en la explotación, los 274 animales restantes se sacrificaron y se procedió a la realización del cultivo microbiológico, confirmándose la infección (presencia de lesiones compatibles y/o cultivo positivo) en 71 de ellos. La proporción de reactivos detectados con la IDTB (19,5%, IC 95%, 15,3-24,6) fue significativamente menor (test Chi-cuadrado de Pearson, $p<0,05$) que la obtenida con los dos ELISAs evaluados, independientemente del criterio empleado en el kit C (Tabla 17).

Al emplear las instrucciones descritas por el fabricante, de nuevo el kit Bovigam detectó una proporción de reactivos significativamente superior (test Chi-cuadrado de Pearson, $p<0,05$) que el kit C/1 (32,1% frente a 23,5%) (Tabla 17). Al evaluar los criterios alternativos analizados con el kit C, a diferencia de lo observado en el primer panel de muestras, la mayor proporción de reactivos se obtuvo con el kit C/3 (104/277 37,5%), seguido del C/2 (103/277 37,2%) (Tabla 17).

En el conjunto de animales con infección confirmada, el valor T+/C+ alcanzado por el kit Bovigam fue superior al obtenido con el kit C/1, mientras que al considerar los criterios alternativos los criterios kit C/2 y kit C/3 el valor T+/C+ fue similar (Tabla 17), siendo la concordancia entre los kits entre moderada y buena (0,51-0,80).

Tabla 17. Reactores obtenidos sobre el total de animales analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección (T+/C+) incluidos en tercer panel de muestras.

| | | Reactores (n=277) | T+/C+ (n=71) |
|---------|------------------|---------------------------------------------|--------------------------|
| Técnica | IDTB * | 54; 19,5% (15,3-24,6) ⁴ | 35; 49,3% (38,0-60,7) |
| | kit Bovigam | 89; 32,1% (26,9-37,8) | 57; 80,3% (69,6-88,9) |
| | kit C S/P≥35% | C ¹ 65; 23,5% (18,9-28,8) | 48; 67,6% (56,1-77,3) |
| | | C ² 103; 37,2% (31,7-43,0) | 61; 85,9% (76,0-92,2) |
| | | C ³ 104; 37,5% (32,1-43,4) | 55; 77,5% (66,5-85,6) |

*IDTB: prueba realizada en la región cervical, interpretación severa;

¹Interpretación realizada según las instrucciones del fabricante; ²Interpretación empleada por el kit Bovigam; ³Interpretación considerando como "muestra control" aquella estimulada con el PBS; ⁴IC Wilson, 95%.

Valores cuantitativos (DO) de los tres kits evaluados

En el presente estudio, además de poner de manifiesto las diferencias en la proporción de animales positivos con los distintos kits para la detección de IFN- γ , se evaluó el valor cuantitativo obtenido al estimular las muestras con PBS, PPD aviar y PPD bovina. En conjunto los valores de DO obtenidos (independientemente del antígeno empleado en la estimulación de las muestras) fueron superiores empleando el kit C.

En el primer panel de muestras la correlación entre la DO obtenida utilizando el kit Bovigam y los kits B y C fue inferior en la muestra estimulada con el PBS ($\rho < 0,3$) en relación a las muestras estimuladas con las PPDs aviar y bovina ($\rho > 0,90$ y $0,80$, respectivamente). Se observaron diferencias significativas (test de Friedman, $p < 0,05$) entre los resultados obtenidos con el kit Bovigam (mediana 0,06, IQR 0,05-0,09) y los kits B (mediana 0,08, IQR 0,07-0,12) y C (mediana 0,08, IQR 0,08-0,10) al emplear el PBS (Figura 16). La correlación alcanzada entre el kit B y el kit C fue moderada ($\rho > 0,50$) independientemente del antígeno empleado para la estimulación de las muestras, observándose diferencias significativas (test de Friedman, $p < 0,05$), entre el kit Bovigam y el kit C, y entre los kits B y C con las PPDs aviar y bovina respectivamente.

De manera similar a lo observado en el primer panel, en el tercer panel (Figura 17), los valores de DO obtenidos con el kit C fueron significativamente superiores a los alcanzados con el kit Bovigam (test de Wilcoxon, $p < 0,05$) independientemente del antígeno considerado. La correlación obtenida entre los resultados obtenidos con el kit Bovigam y el kit C en la muestra estimulada con el PBS ($\rho = 0,20$), fue muy inferior a la alcanzada cuando se estimuló con las PPDs aviar y bovina ($\rho = 0,94-0,98$), respectivamente.

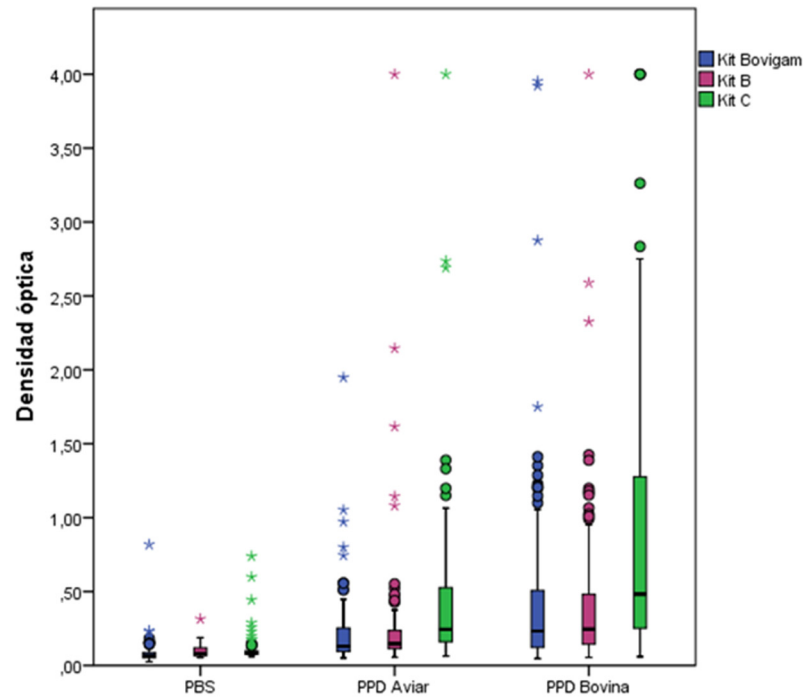


Figura 16. Valores de DO obtenidos al estimular las muestras del primer panel con PBS, PPD aviar y PPD bovina al realizar el ELISA con el kit Bovigam (azul), kit B (morado) y con el kit C (verde). Las cajas representan la mediana y el IQR (mínimo-máximo), los asteriscos indican la presencia de valores extremos y los círculos indican valores atípicos.

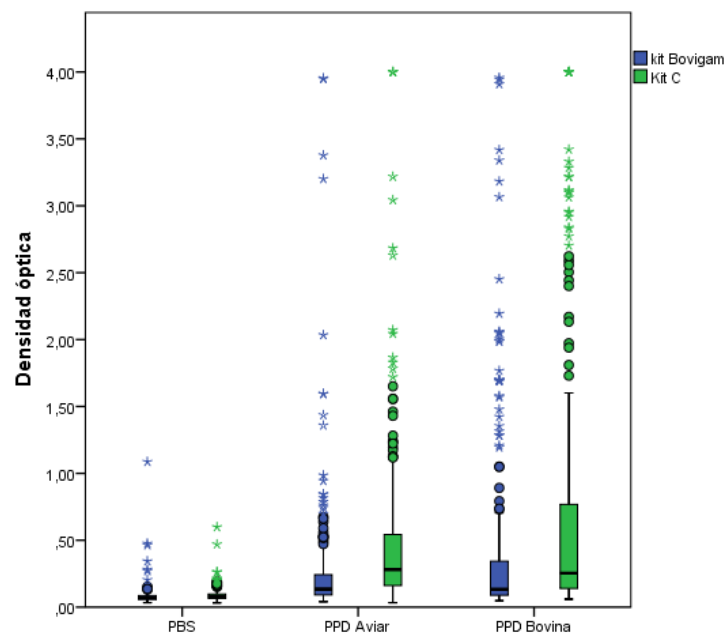


Figura 17. Valores de DO obtenidos al estimular las muestras del tercer panel con PBS, PPD aviar y PPD bovina al realizar el ELISA con el kit Bovigam (azul), y con el kit C (verde). Las cajas representan la mediana y el IQR (mínimo-máximo), los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.

Los valores cuantitativos del segundo panel se evaluaron de manera independiente porque las muestras se habían clasificado antes de la realización de los ELISAs en función al resultado de DO obtenido con el kit Bovigam. En cada uno de los cuatro grupos, el valor de DO obtenido con el kit C fue superior al del kit Bovigam, aunque las diferencias fueron más evidentes en los grupos 3 y 4 (aquellos en los que el valor de DO de la muestra estimulada con la PPD bovina con el kit Bovigam realizado antes del estudio había sido más elevado) (Figura 18). El valor de DO obtenida con el kit C fue significativamente superior (test de Wilcoxon, $p < 0,05$) al alcanzado con el kit Bovigam independientemente del antígeno empleado para estimular las muestras.

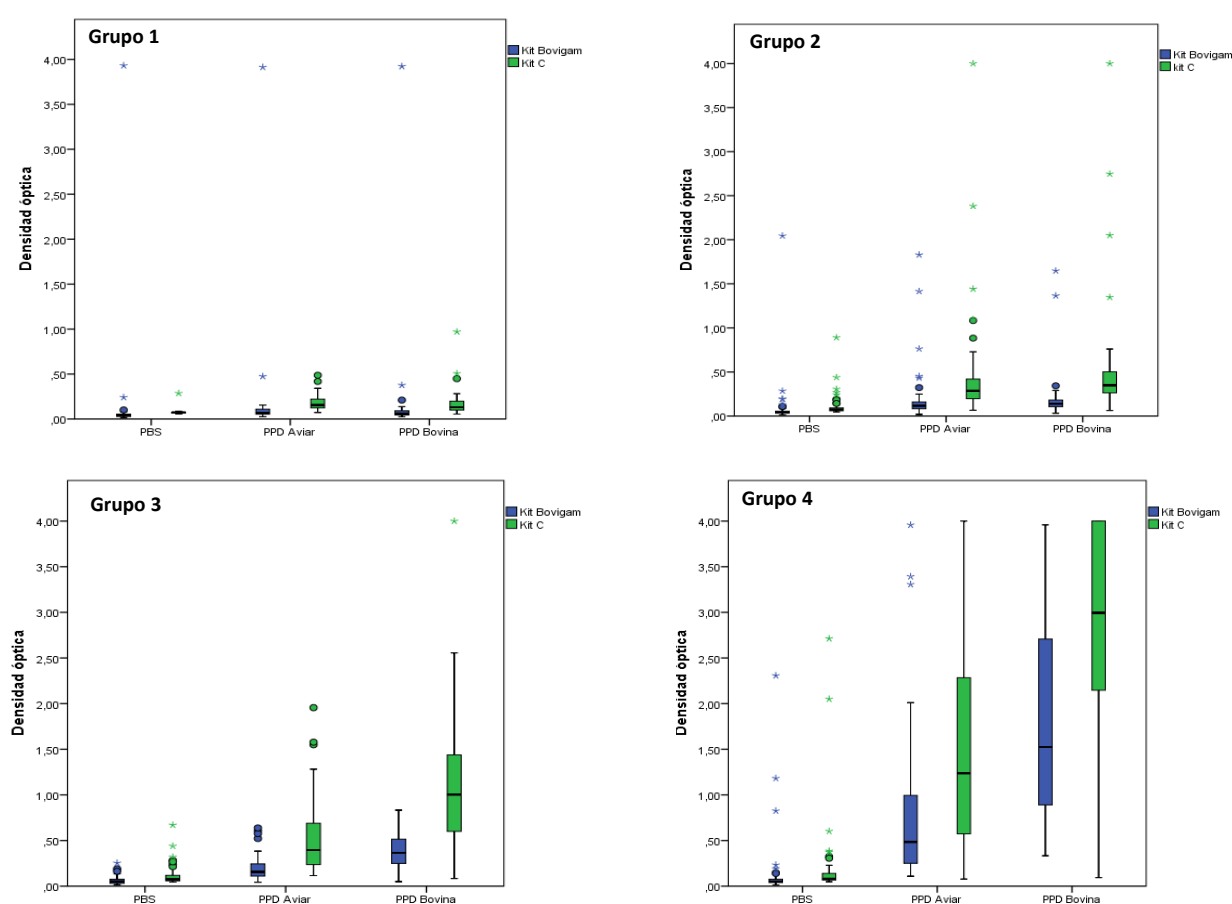


Figura 18. Valores de DO obtenidos al estimular las muestras del segundo panel de muestras con PBS, PPD aviar y PPD bovina al realizar el ELISA con el kit Bovigam (azul) y con el kit C (verde), en el grupo 1 ($n=37$, $DO < 0,05$), grupo 2 ($n=73$, $0,05 < DO < 0,1$), grupo 3 ($n=58$, $0,1 < DO < 0,5$) y grupo 4 ($n=56$, $DO > 0,5$) respectivamente. Las cajas representan la mediana y el IQR (mínimo-máximo), los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.

3.1.3.3. Resumen

Los resultados obtenidos en el tercer estudio experimental ponen de manifiesto que existen diferencias significativas en la proporción de animales detectados en función del kit comercial seleccionado para la realización del test de detección de IFN- γ . Siguiendo las

instrucciones recomendadas para cada fabricante para la interpretación de los resultados el kit que detectó una mayor proporción de reactores en los tres paneles de muestras (sobre el total de muestras analizadas y sobre aquellos en los que se confirmó la infección) fue el kit Bovigam. Al realizar una interpretación alternativa en la lectura de los kits B y C (empleando el criterio del kit Bovigam) se detectó no obstante una proporción superior de animales que al emplear el criterio recomendado por el fabricante, siendo en algún caso superior al obtenido en el kit Bovigam. En todo caso, las diferencias en el rendimiento de los distintos kits fueron más evidentes cuando el valor de DO obtenido estaba próximo al punto de corte establecido para el kit Bovigam. El limitado número de animales infectados sacrificados no permite extraer conclusiones definitivas, pero sugiere que las diferencias obtenidas en la proporción de animales infectados podría traducirse en diferencias de sensibilidad al emplear los distintos kits comerciales.

3.2. CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE UNA NUEVA VACUNA FRENTE A LA TUBERCULOSIS HUMANA (*M. TUBERCULOSIS* SO2) EN GANADO CAPRINO

La vacunación frente a la tuberculosis en el ser humano es una práctica que se viene realizando desde 1921 empleando la vacuna *M. bovis* BCG, con el fin de lograr el control de la enfermedad y limitar la aparición de nuevos casos. La vacuna *M. bovis* BCG ha demostrado que previene la tuberculosis diseminada en niños, a pesar de que su eficacia puede verse comprometida en determinadas situaciones. En las últimas décadas se han desarrollado diferentes alternativas a la vacuna *M. bovis* BCG obtenidas a partir de la misma cepa así como de otras especies incluidas en el MTBC, sin lograr hasta la fecha reunir las características necesarias para su aprobación. Actualmente se está evaluando el empleo de una vacuna modificada genéticamente obtenida a partir de *M. tuberculosis* que se encuentra en fase clínica en humanos, por lo que hasta la fecha no existe información disponible sobre su eficacia, la respuesta inmune que desencadena y la interferencia que esta produciría con las pruebas diagnósticas de la tuberculosis bovina y caprina. La vacunación del ganado bovino frente a la tuberculosis no está permitida ya que origina fenómenos de interferencia con las pruebas diagnósticas oficiales, imposibilitando la diferenciación entre animales infectados o vacunados. Sin embargo, el desarrollo de una vacuna más eficaz y segura, así como de pruebas que garanticen una interferencia diagnóstica mínima o nula, permitiría valorar la vacunación frente a la tuberculosis como una estrategia potencial en aquellas situaciones en las que su uso se considere una alternativa. Además, en trabajos previos se ha demostrado que el ganado caprino es un buen modelo experimental para realizar estudios aplicados al ser humano, por lo que los resultados obtenidos pueden ser de gran utilidad para el hombre.

El capítulo II engloba un objetivo específico centrado en esta hipótesis, que ha servido para la realización del cuarto estudio experimental de la presente tesis doctoral.

3.2.1. Cuarto estudio experimental: interferencia producida con la vacuna *M. tuberculosis* SO2 en el diagnóstico de tuberculosis en ganado caprino

El cuarto estudio experimental se diseñó para evaluar la interferencia diagnóstica de una nueva vacuna frente a la tuberculosis (*M. tuberculosis* SO2) administrada mediante distintas vías. La finalidad del estudio fue evaluar por primera vez la interferencia ocasionada en las pruebas diagnósticas de base celular, así como la respuesta inmune desarrollada en el hospedador tras la vacunación. El estudio se realizó en ganado caprino libre de la enfermedad con el fin de poder valorar la especificidad de las pruebas diagnósticas oficiales actualmente en uso para la detección de la tuberculosis bovina y caprina, realizadas con las PPDs y con dos formulaciones de antígenos específicos de *M. bovis*. **Este cuarto estudio experimental se enmarca dentro del capítulo II.**

Para el desarrollo de este estudio se empleó la vacuna *M. tuberculosis* SO2 (de forma abreviada vacuna SO2), la cual es una vacuna viva atenuada obtenida a partir de la cepa *M. tuberculosis* MT103 que presenta una inactivación en su genoma en el gen *PhoP* (Cardona *et al.*, 2009, Martín *et al.*, 2006). Este gen es fundamental en la regulación de fenómenos de virulencia de la micobacteria, ya que controla la secreción de proteínas antigénicas vinculadas a la región RD1. Debido a la inactivación que presenta la vacuna SO2, todas las proteínas en cuya regulación está implicada la región RD1 se expresan de manera reducida. En el presente trabajo se empleó también la vacuna *M. bovis* BCG, es una vacuna viva atenuada que se desarrolló tras realizar cultivos sucesivos de la cepa original (*M. bovis*), proceso que provocó la delección de ciertos genes asociados a factores de virulencia localizados en la región RD1 del genoma (Mahairas *et al.*, 1996). Debido a este proceso de atenuación, aquellas proteínas en cuya expresión está implicada la región RD1 no se identifican en los animales vacunados con *M. bovis* BCG.

En el presente estudio se empleó la vacuna *M. bovis* BCG [facilitada por la Universidad de Zaragoza (UNIZAR, España)] y la vacuna experimental *M. tuberculosis* SO2 [desarrollada por UNIZAR y distribuida por Biofabri (España)].

3.2.1.1. Material y métodos

3.2.1.1.1. Población en estudio

Para la realización de este trabajo se seleccionaron un total de 36 chivas hembras de la raza Murciano-Granadina con una edad aproximada entre 42 y 60 días, procedentes de un rebaño libre de tuberculosis. Antes del comienzo del estudio los animales se sometieron a un test de detección de IFN- γ para confirmar la ausencia de reacciones positivas en los individuos seleccionados.

Durante la duración del estudio (24 semanas), los animales se mantuvieron bajo condiciones de bioseguridad con la autorización de las autoridades pertinentes [Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (ref. B/ES/12/36)]. Antes del comienzo del estudio fue necesario realizar modificaciones con el fin de aislar la instalación (se cercó mediante un doble vallado) y evitar el acceso de otros animales a la misma y durante todo el estudio las instalaciones se mantuvieron controladas para limitar el acceso exclusivo de personal autorizado. Además, se elaboró un protocolo de trabajo específico y se impartió formación del personal implicado en el estudio, limitando el acceso del personal no autorizado a las instalaciones. Para la manipulación de los animales fue obligatorio el uso de EPIs desechables. Asimismo, tras finalizar cada manipulación el material empleado se sometió a limpieza y descontaminación y por último, los residuos generados durante el estudio se recogieron semanalmente y se destruyeron en una empresa autorizada para tal fin. Los animales dispusieron de comida y agua *ad libitum* a lo largo de todo el estudio.

3.2.1.1.2. Diseño experimental

Con el fin de evaluar la interferencia diagnóstica y la respuesta inmune desarrollada tras el empleo de la vacuna SO2 y de la vacuna *M. bovis* BCG en ganado caprino libre de tuberculosis, se realizó la IDTB simple y comparada en dos ocasiones (11 y 22 semanas tras la vacunación), y el test de detección de IFN- γ una vez por semana hasta la semana 16 tras la vacunación, a partir de ahí se realizó cada quince días durante todo el estudio.

Para el diseño experimental del presente trabajo los animales se clasificaron en cuatro grupos, en uno se mantuvieron animales sin vacunar, mientras que en los otros se empleó la vacuna *M. bovis* BCG, y la vacuna SO2 administrada por la vía intranasal (IN) y la vía subcutánea (SC).

Antígenos alternativos evaluados

De manera adicional a las PPDs empleadas de rutina en las pruebas diagnósticas de base celular, para el presente trabajo se incluyeron antígenos presentes en *M. bovis* y ausentes en la vacuna *M. bovis* BCG (Vordermeier *et al.*, 2011). Se ha comprobado que su empleo en las pruebas diagnósticas de tuberculosis minimiza la interferencia originada tras la vacunación con *M. bovis* BCG, permitiendo diferenciar entre animales infectados y/o vacunados (Whelan *et al.*, 2010a). Sin embargo, hasta la fecha no existían datos sobre el rendimiento de estos antígenos alternativos en animales vacunados de forma experimental con la vacuna SO2.

Las formulaciones antigénicas (de origen sintético) empleadas, fueron desarrolladas y suministradas por *Animal and Plant Health Agency (APHA, Reino Unido)*. En la IDTB se incluyeron dos cócteles proteicos (STR1 y STR2) fabricados específicamente para su uso en

esta prueba. El STR1 era un cóctel proteico compuesto por ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, mientras que el STR2 contenía los tres anteriores y además el antígeno Rv3020c. En el test de detección de IFN- γ se emplearon dos cócteles antigénicos específicos para la estimulación de las sangres, uno estaba compuesto por ESAT-6 y CFP-10 y otro únicamente con el antígeno Rv3615c.

Vacunación

Para el presente estudio se consideró el día cero como aquel en que se realizó la vacunación de los animales. En ninguno de los grupos incluidos se realizó revacunación de los animales.

Conforme al diseño experimental mencionado, los animales se distribuyeron en cuatro grupos. El grupo 1 (grupo control, n=10) en el que se seleccionaron animales no vacunados que se mantuvieron bajo las mismas condiciones que el resto. El grupo 2 (n=6), estaba formado por animales vacunados vía SC con la vacuna *M. bovis* BCG 1-4 x 10⁵ UFCs, mediante la administración de un volumen de 0,5 ml en la región escapular a todos los animales. El grupo 3 (n=10), estaba constituido por animales vacunados vía IN con la vacuna SO2 1 x 10⁵ UFCs, mediante la administración de un volumen de 0,5 ml por un orificio nasal. Por último, el grupo 4 (n=10) animales vacunados vía SC con la vacuna SO2 1 x 10⁵ UFCs, según el protocolo empleado en los animales del grupo 2.

IDTB simple y comparada

La IDTB simple y comparada se realizó en las semanas 11 y 22 tras la vacunación de los animales. Para la IDTB simple se aplicó el protocolo descrito anteriormente (primer estudio experimental) y para la IDTB comparada se efectuaron de forma simultánea dos inoculaciones en la zona cervical anterior (0,1 ml cada una) usando PPD aviar (0,5 mg/ml; 2.500 IU) y PPD bovina (1 mg/ml; 2.500 IU) (CZ Veterinaria, España). De manera adicional, en el lado derecho se inocularon los cócteles STR1 y STR2 (100 μ g por proteína/ml cada uno).

Con el fin de evitar variaciones en el resultado de la IDTB debidas a diferencias en la posición en la que se inocularon los distintos antígenos se siguió un modelo de cuadrado latino (Chilton, 1955). Para el análisis de los resultados de la IDTB simple y comparada se empleó la interpretación estándar de la IDTB cervical simple y comparada (Anexo I).

Test de detección de IFN- γ

La extracción de sangre se realizó empleando tubos con heparina de litio previa realización de la IDTB simple y comparada, y posteriormente las muestras se trasladaron antes de transcurridas 8 horas a un laboratorio autorizado para realizar la estimulación empleando las PPDs de rutina (CZ Veterinaria, España). De manera adicional, cada cuatro

semanas se preparaban dos alícuotas extra de sangre de cada animal para estimularlas con los dos cócteles antigénicos (55 µg/ml cada uno). Tras la estimulación de las muestras se realizó la recogida del plasma, según el protocolo descrito anteriormente (segundo estudio experimental).

Para la cuantificación de la producción de IFN-γ específico se empleó el kit Bovigam (*Thermo Fisher Scientific, USA*), tanto el protocolo de realización y como su interpretación se han descrito previamente (segundo estudio experimental). Aparte del criterio de interpretación empleado de rutina en España (Anexo I), se aplicó el punto de corte de 0,1.

Para los dos cócteles antigénicos evaluados, se consideró un animal positivo cuando la DO del cóctel menos la DO del PBS fue igual o superior a 0,05 (sin tener en cuenta la DO obtenida al estimular las muestras con la PPD aviar), también se incluyó el punto de corte de 0,1 para valorar los resultados obtenidos.

3.2.1.1.3. Análisis estadístico

Para valorar la interferencia producida en las distintas pruebas diagnósticas evaluadas se comparó la proporción de reactores obtenida con cada una con el test Chi-cuadrado de Pearson y el test de Fisher, además los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron mediante el método de Wilson analizando los datos con el programa *Win Pepi [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35]*. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (V.20 *IBM Inc., Chicago, IL, USA*), cualquier respuesta positiva a las pruebas diagnósticas realizadas, se consideró como una reacción no específica.

3.2.1.2. Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio se detallan en función de la prueba diagnóstica realizada (en primer lugar la IDTB simple y comparada) y en segundo lugar los resultados obtenidos con el test de detección de IFN-γ. Un animal del grupo 2 (vacunado con *M. bovis* BCG) murió por causas naturales 15 semanas tras la vacunación.

IDTB simple y comparada

La IDTB (tanto simple como comparada) no identificó ningún animal positivo en el grupo control cuando se efectuó 11 semanas tras la vacunación de los animales, independientemente del antígeno empleado para su realización. Se observó un incremento significativo (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$) en el número de reactores en los grupos vacunados al compararlos con el grupo control cuando la IDTB se realizó empleando las PPDs, ya que se detectó al menos un reactor en todos los grupos vacunados.

Cuando la IDTB simple se realizó con las PPDs en el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG) reaccionaron 4 animales (66,7%, IC 95%, 30,0-90,3), en el grupo 3 (vacuna SO2 IN) se identificaron 9 animales (90,0%, IC 95%, 59,6-98,2), mientras que en el grupo 4 (vacuna SO2 SC) hubo 7 animales positivos (70,0%, IC 95%, 39,7-89,2), siendo significativamente superior (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$) al número de reactores obtenidos comparado con el resultado de la IDTB simple realizada 22 semanas tras la vacunación. Al realizar la IDTB comparada, el número de reactores fue idéntico al obtenido con la IDTB simple en el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG), pero menor en los grupos 3 (seis animales positivos) y 4 (cuatro animales positivos) (vacuna SO2 vía IN y vía SC respectivamente). Cuando la IDTB se empleó con los cócteles antigénicos se identificó un animal reactor (10%, IC 95%, 1,8-40,4) en el grupo 3 y un animal en el grupo 4 (vacuna SO2 vía IN y vía SC) con el cóctel STR1, mientras que con el cóctel STR2 no hubo ningún animal positivo en ningún grupo vacunado. Respecto a los resultados cuantitativos observados, el incremento (mediana en mm) del grosor de la piel inoculada con la PPD bovina fue de 10,5 (IQR 8-14) mientras que el valor obtenido con la PPD aviar fue 1,5 (IQR 1-2). En el presente trabajo todos los reactores a la IDTB simple lo fueron también a la IDTB comparada, siendo la mediana del incremento del pliegue cutáneo obtenido en la diferencia bovina menos el de la diferencia en la localización aviar de 9 (IQR 6-12). El número de reactores y la especificidad obtenidos al realizar la IDTB simple y comparada 11 y 22 semanas tras la vacunación empleando las PPDs y los dos cócteles antigénicos (STR1 y STR2), aparecen detallados en la Tabla 18.

Al comparar los resultados obtenidos en la IDTB realizada con las PPDs o los cócteles antigénicos, en todos los casos el número de reactores fue inferior al emplear los cócteles (Tabla 18). En el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG) hubo cuatro reactores (66,7%) cuando se empleó IDTB simple o comparada mientras que no se identificó ningún animal positivo con ninguno de los cócteles. En el grupo 3 (vacuna SO2 IN) al emplear la PPD bovina hubo nueve positivos (90,0%), con la IDTB comparada se detectaron 6 animales (60,0%, IC 95%, 31,3-83,2) mientras que el STR1 identificó un reactor (10,0%) y ninguno con el STR2. Por último en el grupo 4 (vacuna SO2 SC) hubo siete positivos con la IDTB simple (70,0%), cuatro con la IDTB comparada (40,0%, IC 95%, 16,8-68,7) y al emplear el cóctel STR1 hubo un animal positivo (10,0%) (Tabla 18).

Igualmente a lo observado en la primera IDTB, cuando se efectuó la segunda (tanto simple como comparada) en la semana 22 tras la vacunación, no se identificó se ningún animal positivo en el grupo control, independientemente del antígeno empleado para su realización. En este segundo análisis, se detectó una menor proporción de animales reactores en todos los grupos vacunados comparado con el resultado obtenido cuando la prueba se realizó 11 semanas tras la vacunación, observándose una mayor interferencia con la IDTB simple ya que en la primera prueba simple hubo 20 reactores (55,6%) y en la segunda prueba se identificaron ocho (22,9%), mientras que con la primera IDTB comparada hubo 14 reactores

(38,9%) disminuyendo a cuatro (11,4%) en la prueba realizada 22 semanas tras la vacunación. Al emplear los cócteles antigénicos también disminuyó el número de reactores en el segundo muestreo, pasando de dos (5,7%) a ninguno con el STR1, mientras que el STR2 no clasificó ningún animal como reactor en la IDTB realizada 11 o 22 semanas tras la vacunación (Tabla 18).

Tabla 18. Número de reactores y especificidad obtenidos al realizar la IDTB simple y comparada con las PPDs y los cócteles antigénicos STR1 y STR2, 11 y 22 semanas post-vacunación en los cuatro grupos (G1 control, G2 vacuna BCG, G3 vacuna SO2 vía IN y G4 vacuna SO2 vía SC). Para el análisis de los resultados se empleó la interpretación estándar de la IDTB (simple y comparada).

| 11 semanas post-vacunación | | | | |
|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Grupo | IDTB* | IDTBC* | STR1 | STR2 |
| G1 Control (n=10) | 0; 100% (72,2-100) ¹ | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) |
| G2 BCG (n=6)² | 4; 33,3%** (9,7-70,0) | 4; 33,3%** (9,7-70) | 0; 100% (61,0-100) | 0; 100% (60,9-100) |
| G3 SO2 IN (n=10) | 9; 10%** (1,8-40,4) | 6; 40%** (16,8-68,7) | 1; 90% (59,6-98,2) | 0; 100% (72,2-100) |
| G4 SO2 SC (n=10) | 7; 30%** (10,8-60,3) | 4; 60%** (31,3-83,2) | 1; 90% (59,6-98,2) | 0; 100% (72,2-100) |
| 22 semanas post-vacunación | | | | |
| Grupo | IDTB | IDTBC | STR1 | STR2 |
| G1 Control (n=10) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) |
| G2 BCG (n=5) | 2; 60% (23,1-88,2) | 2; 60% (23,1-88,2) | 0; 100% (56,5-100) | 0; 100% (56,5-100) |
| G3 SO2 IN (n=10) | 1; 90% (59,6-98,2) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) |
| G4 SO2 SC (n=10) | 5; 50%** (23,7-76,3) | 2; 80% (49,0-94,3) | 0; 100% (72,2-100) | 0; 100% (72,2-100) |

*IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada; ¹IC Wilson, 95%; **Se detectaron diferencias significativas en el número de reactores comparado con los otros grupos (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$); ²Un animal del grupo 2 murió 15 semanas post-vacunación.

Cuando la IDTB simple se realizó con las PPDs en el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG), se clasificaron como positivos dos animales (40%, IC 95%, 11,8-76,9) y otros dos se consideraron dudosos (los cuales habían sido reactores cuando la prueba se efectuó 11 semanas tras la vacunación). En el grupo 3 (vacuna SO2 IN) se identificó un animal (10%, IC 95%, 1,8-40,4), mientras que en el grupo 4 (vacuna SO2 SC) hubo cinco animales positivos (50%, IC 95%, 23,7-76,3) con la IDTB simple. Al realizar la IDTB comparada, el número de reactores fue idéntico al obtenido con la IDTB simple en el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG), pero menor en los grupos 3 y 4 (vacuna SO2 vía IN y vía SC), ya que la IDTB comparada no clasificó ningún animal en el grupo 3, pero identificó dos animales positivos (20%, IC 95%, 5,7-51,0) en el grupo 4. Cuando la IDTB se empleó con los cócteles antigénicos no se observaron reactores en ninguno de los grupos vacunados. Respecto a los resultados

cuantitativos observados, el incremento del espesor cutáneo observado en la IDTB simple fue inferior comparado con el obtenido en el anterior muestreo [mediana 7,5 (IQR 7-8)] (Tabla 18).

Los resultados obtenidos en la IDTB efectuada 22 semanas tras la vacunación con las PPDs o los cócteles antigénicos indican que el número de animales positivos fue inferior empleando los cócteles. En el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG) hubo dos reactores (40%) cuando se empleó IDTB simple o comparada mientras que no se identificó ningún animal positivo con ninguno de los cócteles. En el grupo 3 (vacuna SO2 IN) al emplear la PPD bovina hubo un positivo (10%) mientras que con la IDTB comparada y los dos cócteles no se identificó ningún reactor. Por último en el grupo 4 (vacuna SO2 SC) hubo cinco positivos con la IDTB simple (50%), dos con la IDTB comparada (20%) y ninguno empleando cualquiera de los dos cócteles (Tabla 18).

Test de detección de IFN- γ

El test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs únicamente detectó una reacción no específica en el grupo control en la semana 14 tras la vacunación (tanto con el punto de corte de 0,05 como el de 0,1), mientras que en los grupos vacunados el número de reactores osciló a lo largo del estudio, sin embargo a pesar de las diferencias observadas, en todos ellos el punto de corte de 0,1 fue más específico que el 0,05, identificando siempre un menor número de animales positivos. Los resultados obtenidos en el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs durante las 24 semanas de duración del estudio aparecen detallados en la Figura 19.

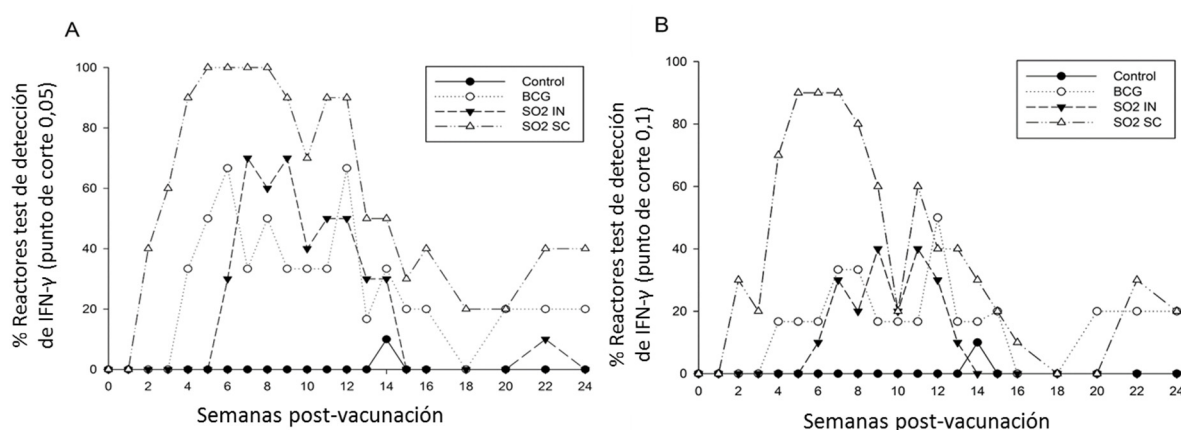


Figura 19. Porcentaje de reactores obtenidos en el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs en todos los grupos incluidos en el presente trabajo. Punto de corte 0,05 (Figura 19A) y punto de corte 0,1 (Figura 19B).

La proporción de reactores observados en el grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG) con el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs (independientemente del punto de corte aplicado), fue significativamente superior (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$) de la

semana 4 a la semana 12 tras la vacunación a la proporción de reactores alcanzados con los otros grupos vacunados. Se observaron diferencias significativas (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$) en el grupo 3 (vacuna SO2 IN) en la proporción de reactores obtenidos durante las semanas 7-12 tras la vacunación con el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs y aplicando el punto de corte 0,05 (Figura 19).

De los tres grupos vacunados evaluados, el grupo 4 (vacuna SO2 SC) fue en el que se detectó mayor interferencia diagnóstica (la proporción de reactores osciló entre 10-100% en función del punto de corte) y de mayor duración (desde la segunda semana tras la vacunación hasta la finalización del estudio) en el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs. Siendo significativamente superior (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$) entre las semanas 4-8 tras la vacunación. Sin embargo, en este grupo la proporción de reactores descendió durante las semanas 12-24 tras la vacunación, aunque siempre fue superior a los animales identificados en los grupos 2 y 3 (vacuna *M. bovis* BCG y vacuna SO2 IN respectivamente) (Figura 19).

Cuando el test de detección de IFN- γ se realizó con las dos formulaciones antigénicas, no se detectó ningún animal del grupo 1 (control) ni del grupo 2 (vacuna *M. bovis* BCG) positivos (tanto con el punto de corte de 0,05 como el de 0,1) durante la duración del estudio. El número de reactores y la especificidad obtenidos en el test de detección de IFN- γ realizado con los antígenos específicos se detallan en la Tabla 19.

En los tres grupos vacunados, el número de reactores identificados en el test de detección de IFN- γ realizado con los antígenos específicos fue significativamente inferior (test Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,05$) que cuando este se realizó con las PPDs, independientemente del punto de corte aplicado. En concreto, al emplear el punto de corte de 0,1 y el antígeno Rv3615c no se identificó ningún animal positivo en el test de detección IFN- γ en los tres grupos vacunados durante la duración del estudio (Tabla 19).

En el grupo 3 (vacuna SO2 vía IN) la interferencia en el test de detección de IFN- γ realizado con sangres estimuladas con el formato antigénico ESAT-6/CFP-10 se observó nueve semanas tras la vacunación, ya que con el punto de corte 0,05 se identificaron dos animales positivos (20%, IC 95% 5,7-51,0) disminuyendo a uno (10%, IC 95% 1,8-40,4) con el punto de corte de 0,1 (Tabla 19). Al igual que mostraron los resultados obtenidos con el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs, el grupo 4 (vacuna SO2 SC) fue en el que se observó una mayor interferencia diagnóstica empleando los cócteles [principalmente con la formulación ESAT-6/CFP-10 ya que con el antígeno Rv3615c únicamente se detectó un animal reactor (10%, IC 95%, 1,8-40,4)] (Tabla 19).

Tabla 19. Número de reactores detectado y especificidad (E) obtenida con el test de detección de IFN- γ estimulando las muestras con el cóctel ESAT-6/CFP-10 y el antígeno Rv3615c durante 22 semanas, empleando el punto de corte de 0,05 y 0,1 en todos los grupos (G1 control, G2 vacuna BCG, G3 vacuna SO2 vía IN y G4 vacuna SO2 vía SC).

| Antígeno/Grupo | | Semanas post-vacunación | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------|---|
| | | 0 | E | 5 | E | 9 | E | 13 | E | 18 | E | 22 | E |
| ESAT-6/CFP-10 | G1 Control (n=10) | 0; 100% (72,2-100) ¹ | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | |
| | G2 BCG (n=6)* | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (56,5-100) | | 0; 100% (56,5-100) | |
| | G3 SO2 IN (n=10) | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 2; 80% ² (49,0-94,0) 1; 90% ³ (59,6-98,2) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | |
| | G4 SO2 SC (n=10) | 0; 100% (72,2-100) | | 5; 50% ² (23,6-76,3) 2; 80% ³ (49,0-94,3) | | 3; 70% ² (39,7-89,2) 1; 90% ³ (59,6-98,2) | | 2; 80% ² (49,0-94,3) 1; 90% ³ (59,6-98,2) | | 1; 90% ² (59,6-98,2) 0; 100% ³ (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | |
| Rv3615c | G1 Control (n=10) | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | |
| | G2 BCG (n=6)* | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (60,9-100) | | 0; 100% (56,5-100) | | 0; 100% (56,5-100) | |
| | G3 SO2 IN (n=10) | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | |
| | G4 SO2 SC (n=10) | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | | 1; 90% ² (59,6-98,2) 0; 100% ³ (72,2-100) | | 0; 100% (72,2-100) | |

¹IC Wilson, 95%; ²Punto de corte 0,05; ³Punto de corte 0,1; *Un animal del grupo 2 murió 15 semanas post-vacunación.

Al evaluar los dos puntos de corte aplicados en el test de detección de IFN- γ realizado con los dos cócteles específicos, de nuevo el punto de corte de 0,1 fue más específico el de 0,05. Únicamente se identificaron diferencias entre los dos puntos de corte en los grupos 3 y 4 (vacuna SO2 vía IN y vía SC), con el cóctel ESAT-6/CFP-10, hubo un reactor de diferencia (grupo 3, vacuna SO2 vía IN) o dos (grupo 4 vacuna SO2 SC), mientras que con el antígeno Rv3615c hubo un animal de diferencia con los dos puntos de corte únicamente en el grupo 4 (vacuna SO2 vía SC) (Tabla 19).

Es necesario indicar que los animales positivos fueron diferentes cuando el test de detección de IFN- γ se realizó con cada uno de los dos cócteles evaluados (ESAT-6/CFP-10 o Rv3615c), por lo que el empleo en serie de los resultados obtenidos en el test de detección de IFN- γ habría alcanzado la especificidad más elevada en los grupos 3 y 4 (vacuna SO2 vía IN y vía SC), ya que empleando este protocolo es necesario que un animal sea positivo a todas las pruebas diagnósticas realizadas para considerarlo como reactor.

3.2.1.3. Resumen

Los resultados obtenidos en el cuarto estudio experimental ponen de manifiesto que la especificidad de la IDTB y del test de detección de IFN- γ en los animales vacunados con la vacuna SO2, fue superior cuando estas se realizaron con los antígenos específicos en

comparación con las PPDs, indicando que antígenos empleados en la estrategia DIVA para diferenciar animales infectados de aquellos vacunados con la vacuna *M. bovis* BCG también podrían ser de utilidad al emplear la vacuna SO2. Además, de los dos grupos de animales en los que se empleó la vacuna SO2, se observó menor interferencia diagnóstica en el grupo vacunado vía IN comparado con el que empleó la vía SC. Al comparar la respuesta inmune desarrollada en el hospedador con las dos vacunas evaluadas, los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de la vacuna SO2 empleando la vía SC desencadena una mayor respuesta celular que cuando se empleó la vacuna *M. bovis* BCG. Cuando se realizó la IDTB simple y comparada con las PPDs de rutina 11 semanas tras la vacunación, el número de reactores fue superior en el grupo vacunado con SO2 vía IN comparado con los demás grupos vacunados. Sin embargo cuando la prueba se realizó 22 semanas tras la vacunación de los animales, el grupo vacuna SO2 vía SC fue el que obtuvo la mayor proporción de reactores a la IDTB simple. Por otra parte, cuando el test de detección de IFN- γ se efectuó empleando las PPDs, la mayor proporción de reactores (con los dos puntos de corte evaluados) se alcanzó en el grupo vacuna SO2 vía SC en todos los muestreos realizados. A pesar del reducido número de animales evaluados (debido a limitaciones relacionadas con la logística y los costes económicos), el presente estudio muestra por primera vez los resultados obtenidos en cuanto a interferencia diagnóstica en ganado doméstico vacunado de forma experimental con la vacuna SO2.

3.3. CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD A LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS Y DE LAS LESIONES DESARROLLADAS EN GANADO CAPRINO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON DISTINTAS ESPECIES DEL MTBC

La tuberculosis es una enfermedad descrita en multitud de especies animales ya que los miembros del MTBC tienen un amplio rango de hospedadores. El desarrollo de la enfermedad tras la infección está condicionado por multitud de factores, siendo el binomio patógeno-hospedador una de las principales variables. La mayoría de los estudios realizados para evaluar las diferencias desencadenadas en la evolución de la respuesta inmune tras la infección se han desarrollado en cultivos celulares o en animales de experimentación, existiendo escasa información al respecto sobre animales domésticos. Además, en diversos trabajos científicos se han descrito diferencias en la respuesta inmune desencadenada tras la infección con distintas cepas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, la información existente actualmente sobre la virulencia de distintas cepas de *M. bovis* es contradictoria. Por otra parte, la comparación de la respuesta inmune desencadenada y la capacidad para desarrollar la enfermedad entre aquellas especies del MTBC que presentan mayor ubicuidad (*M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*,) podría ser determinante para incrementar el rendimiento de las pruebas diagnósticas actualmente en uso para la tuberculosis bovina y caprina. Estos estudios podrían aportar más información sobre aspectos difíciles de definir, tales como el tiempo necesario para que un animal infectado reaccione a las pruebas (mayor o menor periodo de pre-alergia, desarrollo de la respuesta celular y/o humoral) y se convierta en infeccioso (rapidez en la formación, desarrollo y localización de lesiones, etc.) en función de la especie del MTBC implicada.

El capítulo III engloba un objetivo específico centrado en esta hipótesis, que ha servido para la realización del quinto estudio experimental de la presente tesis doctoral.

3.3.1. Quinto estudio experimental: respuesta a la IDTB y al test de detección de IFN- γ y valoración del cuadro de lesiones desarrollado en ganado caprino infectado de forma experimental con tres especies del MTBC

El quinto estudio experimental se diseñó para evaluar el rendimiento de las pruebas diagnósticas de base celular y valorar el cuadro de lesiones desarrollado en ganado caprino infectado de forma experimental con *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*. La finalidad del estudio fue aportar nuevos datos sobre la respuesta inmune desarrollada en el hospedador tras la infección producida por distintas especies del MTBC, al estudiar posibles diferencias en las pruebas diagnósticas de base celular y en la progresión de la infección (localización y extensión de las lesiones tuberculosas) en ganado caprino. **Este quinto estudio experimental se enmarca dentro del capítulo III.**

3.3.1.1. Material y métodos

3.3.1.1.1. Población en estudio

Para la realización de este estudio se seleccionaron 14 cabras, hembras de la raza de Guadarrama y Murciano-Granadina de aproximadamente dos años de edad, procedentes de un rebaño libre de tuberculosis. Dos meses antes del inicio del estudio los animales se sometieron a una IDTB, y una semana antes de realizar la infección experimental se realizó un test de detección de IFN- γ para confirmar su estatus. Para la realización del estudio y conforme con la legislación nacional todos los animales incluidos eran mayores de 6 meses.

A lo largo de la duración del estudio (5 semanas) y de acuerdo con la autorización legal pertinente [Comité Ético (CEA-UCM 37-2013)], los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* en condiciones de bioseguridad. Fue necesario elaborar protocolos y formar al personal implicado en el estudio, para realizar cualquier manipulación de los animales se usaron EPIs desechables, asimismo, tras finalizar cada manipulación el material empleado se sometió a limpieza y descontaminación. Además, las instalaciones tenían acceso restringido y se cercaron con un doble vallado para impedir el contacto con otros animales.

3.3.1.1.2. Diseño experimental

Para evaluar el rendimiento de las pruebas diagnósticas de base celular en ganado caprino infectado de forma experimental con distintas especies del MTBC, se realizó la IDTB simple y comparada cinco semanas tras la infección y el test de detección de IFN- γ se realizó con muestras extraídas semanalmente hasta la finalización del estudio. Tras el sacrificio de los animales se realizó la necropsia detallada y un examen individualizado de distintos linfonodos y órganos siguiendo el protocolo descrito en el Anexo V.

Para la realización del estudio y conforme con la legislación nacional, se esperó el periodo mínimo recomendado de 42 días entre la IDTB realizada en la explotación de origen para confirmar el estatus negativo de los animales y la IDTB del estudio. También se respetó el periodo recomendado de 60 días entre la IDTB y la primera extracción de sangre para el test de detección de IFN- γ . Para el diseño experimental del presente trabajo los animales se clasificaron en tres grupos.

Infección experimental

Se seleccionaron tres especies del MTBC, la cepa *M. bovis* SB0134 y la cepa *M. caprae* SB0157, ambas aisladas de jabalí, y la cepa *M. tuberculosis* SIT58, aislada de ganado bovino. La cepa de *M. bovis* se identificó y fue suministrada por Neiker-Tecnalia (España) mientras que las cepas de *M. caprae* y *M. tuberculosis* pertenecían a la colección de cultivos del centro VISAVET (España). Las micobacterias seleccionadas se cultivaron durante 4-5 semanas en medio líquido Middlebrook 7H9, enriquecido con 0,36% de piruvato de sodio y 10% de la mezcla OADC (Oleico, Albúmica, Dextrosa y Catalasa) (*Becton Dickinson, USA*). Se seleccionaron varias colonias que se centrifugaron a 2.500 g durante 20 minutos y posteriormente se lavaron en PBS. El pellet obtenido se re-suspendió en PBS y se disgregó con una jeringuilla de insulina, posteriormente la turbidez de la suspensión se ajustó a una DO de 1,0 unidades McFarland y se prepararon los inóculos a una concentración de 10^4 UFCs. Se prepararon diluciones seriadas (x10) que se sembraron por duplicado en medio de Lowenstein-Jensen (*Difco, España*) para cuantificar el número de UFCs del inóculo (Romero *et al.*, 2007).

Los animales se infectaron de forma experimental empleando la vía transtorácica según el protocolo descrito según (Bezós *et al.*, 2010) (Figura 20). Para su sedación se empleó Xilagesic 2% vía intravenosa a una dosis de 10 mg/50 kg (Calier S.A., España). Una vez sedados se colocaron en decúbito lateral izquierdo y se localizó el primer espacio intercostal tras la escápula, tras lo cual la zona fue rasurada y desinfectada. La infección experimental se realizó empleando una cánula 18G 1^{1/4} (Introcan, B. Braun, España) introduciendo el inóculo con una pequeña cantidad de aire durante la fase de inhalación en el pulmón derecho.

Cada animal recibió 10^4 UFCs en un volumen final de 0,5 ml, y conforme al diseño experimental mencionado se clasificaron en tres grupos: grupo 1 (n=5) infección con *M. bovis*, grupo 2 (n=5) infección con *M. caprae* y grupo 3 (n=4) infección con *M. tuberculosis*. Tras la infección los animales se mantuvieron monitorizados en un lugar tranquilo hasta su completa recuperación.



Figura 20. Realización de la infección experimental en ganado caprino. Preparación y desinfección de la zona (imagen izquierda), administración del inóculo (imagen derecha).

IDTB simple y comparada

La IDTB simple y comparada se realizó según el protocolo descrito anteriormente (primer y cuarto estudio experimental). En la zona cervical anterior del lado izquierdo de cada animal, se efectuaron simultáneamente dos inoculaciones de 0,1 ml cada una de la PPD aviar (0,5 mg/ml, 2.500 IU) y la PPD bovina (1 mg/ml, 2.500 IU) (CZ Veterinaria, España). En la IDTB realizada cinco semanas tras la infección, se incluyó la PPD humana [tuberculina de Evans, 2 Unidades Tuberculínicas (UT)/ 0,1 ml] empleada de rutina para realizar el test de *Mantoux*, suministrada por el Hospital Ramón y Cajal (España) y obtenida a partir de *M. tuberculosis*. La PPD bovina se inoculó en la zona cervical anterior del lado derecho de los animales.

Para valorar el resultado obtenido con la IDTB cervical simple y comparada se empleó la interpretación estándar y severa (Anexo I).

Test de detección de IFN- γ

La extracción de sangre se realizó empleando tubos con heparina de litio previa realización de la IDTB simple y comparada, y posteriormente las muestras se trasladaron antes de transcurridas 8 horas a un laboratorio autorizado para realizar la estimulación empleando las PPDs de rutina (CZ Veterinaria, España). En el último muestreo realizado se preparó una alícuota adicional de sangre de cada animal, que se estimuló con la PPD humana a la concentración de 2 UT/0,1 ml. Tras la estimulación de las muestras se realizó la recogida del plasma siguiendo protocolo que ya ha sido descrito anteriormente (segundo estudio experimental).

Para la cuantificación de la producción de IFN- γ específico se empleó el kit Bovigam (*Thermo Fisher Scientific, USA*). El protocolo de realización y su interpretación se han descrito

previamente (segundo estudio experimental). Además del criterio de interpretación descrito actualmente en Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina (Anexo I), se aplicó el punto de corte de 0,1 para la interpretación de los resultados obtenidos.

Cultivo microbiológico

Cinco semanas tras la infección experimental los animales se sedaron con Xilagesic 2% vía intravenosa 10 mg/50 kg y se sacrificaron mediante una inyección intravenosa de T61 (Intervet, España) empleando una dosis de 5 ml/10 kg. Posteriormente se sometieron a una necropsia detallada, realizando la observación de lesiones compatibles con tuberculosis que se registraron siguiendo un modelo semi-cuantitativo previamente descrito (Vordermeier *et al.*, 2002). Para la realización del modelo se registró tanto el tamaño como la localización de las lesiones observadas en los linfonodos de la cabeza (parotídeo, submandibular y retrofaríngeo), la cavidad torácica (pulmón y linfonodos mediastínico y traqueobronquial, también se examinó el linfonodo pre-escapular) y la cavidad abdominal (linfonodos mesentéricos, así como la válvula ileocecal y el linfonodo adyacente a la misma, y los linfonodos mamarios), según el sistema detallado en el Anexo II. Por otra parte, también se registró la presencia de lesiones en cualquier otra localización (hígado, bazo, riñones, etc.) en caso de observarse durante la necropsia.

La toma de muestras para la realización del cultivo microbiológico (primer estudio experimental) se realizó clasificando las muestras de cada animal en tres regiones anatómicas. De la región cervical se seleccionaron los linfonodos retrofaríngeos y submandibulares y las tonsilas, de la cavidad torácica se incluyeron los linfonodos pre-escapulares, mediastínicos, traqueobronquiales y tejido pulmonar, y por último, de la cavidad abdominal se seleccionaron los linfonodos mesentéricos así como tejido esplénico y hepático.

3.3.1.1.3. Análisis estadístico

Para comparar los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas entre los distintos grupos, los resultados cuantitativos (aumento del pliegue cutáneo en mm y valores de DO) y cualitativos (positivo/negativo) de las pruebas se registraron en una base de datos y se analizaron mediante el programa SPSS (SPSS V.20 IBM Inc., Chicago, IL, USA). Los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron mediante el método de Wilson analizando los datos con el programa *Win Pepi* [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35]. La significación entre la diferencia (en mm) de la IDTB realizada con los distintos antígenos se analizó con el test de Kruskal-Wallis. Para valorar las diferencias en la DO obtenida en el test de detección de IFN- γ con la PPD bovina entre los tres grupos experimentales incluidos se empleó el test de Mann-Whitney, mientras que para evaluar las diferencias de DO alcanzadas

en un mismo grupo con el test de detección de IFN- γ con la PPD bovina a lo largo de las cinco semanas de duración del experimento se empleó el test de Friedman.

La información recogida en la necropsia se registró en una base de datos para realizar el modelo semi-cuantitativo y comparar posteriormente la presencia de lesiones en los tres grupos experimentales. La asignación del valor cuantitativo se realizó por los mismos veterinarios, con el fin de estandarizar los resultados obtenidos y minimizar la subjetividad. En función de la localización y la extensión de las mismas se estableció una escala numérica que se detalla en la Tabla 20.

Tabla 20. Modelo semi-cuantitativo seguido para clasificar las lesiones observadas en distintos órganos y linfonodos (Vordermeier *et al.*, 2002).

| Órgano/linfonodo | Puntuación | Descripción |
|--------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|
| Pulmón (cada lóbulo por separado) | 0 | sin lesiones visibles |
| | 1 | pequeña lesión visible al corte |
| | 2 | <5 lesiones <10mm |
| | 3 | >6 lesiones <10mm o 1 lesión grande > 10 mm |
| | 4 | > 1 lesión grande >10mm |
| | 5 | grandes lesiones fusionadas (cavernas) |
| Linfonodos y Bazo | 0 | sin necrosis o lesiones visibles |
| | 1 | pequeños focos de 1-2 mm |
| | 2 | focos pequeños o lesiones necróticas de al menos 5x5mm |
| | 3 | necrosis amplia |
| Válvula ileocecal | 0 | sin lesiones aparentes |
| | 1 | válvula congestiva y/o engrosada |
| | 2 | pequeños abscesos |
| | 3 | numerosos abscesos pequeños |
| | 4 | uno o varios abscesos de gran tamaño |

3.3.1.2. Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio se detallan en función de la prueba diagnóstica realizada (en primer lugar IDTB simple y comparada y en segundo lugar el test de detección de IFN- γ), se emplea el término sensibilidad y reactores ya que no se pudo confirmar la infección en todos los individuos de cada grupo. De los 14 animales infectados de manera experimental se confirmó la infección en 11 (presencia de lesiones compatibles y/o cultivo microbiológico positivo), hubo dos animales infectados con *M. caprae* y otro infectado con *M. tuberculosis* en los que no fue posible confirmar la presencia del patógeno ni se observaron lesiones compatibles con la enfermedad.

IDTB simple y comparada

Para la realización de la IDTB simple y comparada, la inoculación de las distintas PPDs (aviar, bovina y humana) se realizó 5 semanas tras la infección. No se observaron diferencias significativas (test de Kruskal-Wallis, $p>0,05$) en el incremento de espesor del pliegue cutáneo

(en mm) de la IDTB simple independientemente del antígeno empleado entre los tres grupos infectados.

Todos los animales fueron positivos a la IDTB simple (independientemente de la interpretación aplicada), y a la IDTB comparada con la interpretación severa (excepto uno de los dos animales del grupo infectado con *M. caprae* en el que no se pudo confirmar la infección). El otro animal infectado con *M. caprae* y aquel infectado con *M. tuberculosis*, fueron positivos a la IDTB simple y comparada independientemente de la interpretación empleada. Cuando se empleó la interpretación estándar en la IDTB comparada dos y un animal positivos con la interpretación severa se habrían clasificado como negativos en los grupos 2 (*M. caprae*) y 3 (*M. tuberculosis*). Los resultados obtenidos en la IDTB simple y comparada en los tres grupos aparecen detallados en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados de la IDTB simple y comparada PPDs aviar, bovina y humana (interpretación severa), realizada cinco semanas post-infección. Grupo 1: *M. bovis*, grupo 2: *M. caprae*, grupo 3: *M. tuberculosis*, media/mediana (mm).

| Grupo | Resultados | IDTB* | IDTBC* | IDTB (PPD h) ¹ |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| G1 <i>M. bovis</i> (n=5) | Reactores % | 5; 100% (56,6-100) ² | 5; 100% (56,6-100) | 3; 60% (23,1-88,2) |
| | Media Mediana (IQR)³ | 16,4 17 (11-19) ³ | 10,8 11 (7-15) | 2,8 3 (2-4) |
| G2 <i>M. caprae</i> (n=5) | Reactores % | 5; 100% (5,67-100) ¹ | 4; 80% (37,6-96,4) | 3; 60% (23,1-88,2) |
| | Media Mediana (IQR) | 12 12 (7-18) | 6,2 8 (0-11) | 2,4 3 (1-3) |
| G3 <i>M. tuberculosis</i> (n=4) | Reactores % | 4; 100% (51,0-100) | 4; 100% (51,0-100) | 0; 0% (0-49,0) |
| | Media Mediana (IQR) | 11,7 12,5 (6-16) | 8,2 9 (2-13) | 1,5 1,5 (1-2) |

*IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada; ¹ PPD humana: PPD-h; ²IC Wilson, 95%;

³IQR (mínimo – máximo).

Cuando se empleó la PPD humana, el rendimiento obtenido en la IDTB fue menor que al realizar la prueba simple con la PPD bovina, ya que la proporción de reactores fue inferior en todos los casos. En el grupo 1 (*M. bovis*) la sensibilidad de la IDTB con la PPD humana fue del 60% con la interpretación severa (se identificaron tres animales infectados) disminuyendo al 20% (IC 95%, 3,6-62,4) con la interpretación estándar (se identificó un animal infectado mientras que dos se consideraron dudosos y dos negativos). En el grupo 2 (*M. caprae*), de los 3 animales infectados la sensibilidad de la IDTB realizada con la PPD humana fue de 33,3% (IC 95%, 6,2-7,9) ya que identificó uno de los tres animales infectados con la interpretación severa, mientras que con la interpretación estándar no hubo ningún animal infectado positivo (el animal positivo con la interpretación severa se consideraría dudoso y los otros dos negativos). Los dos animales del grupo 2 (*M. caprae*) en los que no se pudo confirmar la infección fueron reactores con la interpretación severa y dudosos con la

interpretación estándar a la IDTB realizada con la PPD humana. En el grupo 3 (*M. tuberculosis*) no se detectó ningún animal como positivo (ni sobre los infectados ni sobre aquel en el que no fue posible confirmar la infección) cuando la IDTB se realizó con la PPD humana con cualquiera de las dos interpretaciones incluidas (Tabla 21).

Test de detección de IFN- γ

El test de detección de IFN- γ se realizó con muestras extraídas semanalmente hasta la finalización del estudio empleando las PPDs aviar y bovina y en el último muestreo, realizado 5 semanas tras la infección, se incluyó la PPD humana. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 22.

En el grupo 1 (*M. bovis*) se identificó correctamente la totalidad de animales infectados con el test de detección de IFN- γ realizado con muestras obtenidas cuatro y cinco semanas tras la infección, alcanzado una sensibilidad del 100%. Además, en el grupo 1 (*M. bovis*) hubo animales que reaccionaron al test dos semanas tras la infección mientras que en los otros grupos evaluados las respuestas positivas aparecieron tres semanas tras la infección experimental. Además, los valores de DO del grupo 1 (*M. bovis*) en el muestreo realizado dos semanas tras la infección fueron significativamente superiores (test de Mann-Whitney, $p=0,03$) a los valores de DO obtenidos con los otros dos grupos experimentales en ese mismo muestreo.

En el grupo 2 (*M. caprae*) se identificó correctamente la totalidad de animales infectados con el test de detección de IFN- γ realizado con muestras obtenidas cuatro y cinco semanas tras la infección, alcanzado una sensibilidad del 100%. Además, cuando las muestras se recogieron tres semanas tras la infección los dos animales de este grupo en los que no se pudo confirmar la infección fueron reactores en el test de detección de IFN- γ y hasta la finalización del estudio, además de un animal de los tres en los que se había confirmado la infección. En el grupo 3 (*M. tuberculosis*) los tres animales infectados fueron positivos en el test de detección de IFN- γ realizado con muestras recogidas tres semanas tras la infección y hasta la finalización del estudio, con una sensibilidad del 100%. El animal de este grupo en el que no se pudo confirmar la infección fue negativo en el test de detección de IFN- γ durante las muestras obtenidas a lo largo de todo el estudio (Tabla 22). En el muestreo realizado cinco semanas tras la infección, cuando el test de detección de IFN- γ se realizó estimulando las muestras con la PPD humana no se detectó ningún reactor en los tres grupos estudiados. Además se observaron diferencias en el valor de DO alcanzado con los diferentes antígenos siendo los valores de la PPD humana significativamente inferiores (test de Kruskal-Wallis, $p<0,05$) comparado con los valores de DO obtenidos con la PPD aviar y bovina. Cuando se empleó la PPD aviar la mediana del valor de DO fue 0,23 (IQR 0,11-0,41), mientras

que con la PPD bovina el valor de la mediana fue 1,36 (IQR 0,48-2,81) y al emplear la PPD humana el valor de la mediana disminuyó a 0,04 (IQR 0,04-0,06).

Tabla 22. Resultados obtenidos en el test de detección de IFN- γ estimulando las muestras con la PPD bovina (PPD-b) o con la PPD humana (PPD-h). Grupo 1: *M. bovis*, Grupo 2: *M. caprae*, Grupo 3: *M. tuberculosis*.

| Grupo | | Semanas post-infección | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| G1 (n=5) | PPD-b ¹ | 0; 0% (0-43,5) ² | 0; 0% (0-43,5) | 4; 80% (37,6-96,4) | 4; 80% (37,6-96,4) | 5; 100% (56,6-100) | 5; 100% (56,6-100) |
| | PPD-h ³ | | | | | | 0; 0% (0-43,5) |
| G2 (n=5) | PPD-b | 0; 0% (0-43,5) | 0; 0% (0-43,5) | 0; 0% (0-43,5) | 3; 60% (23,1-88,2) | 5; 100% (56,6-100) | 5; 100% (56,6-100) |
| | PPD-h | | | | | | 0; 0% (0-43,5) |
| G3 (n=4) | PPD-b | 0; 0% (0-49,0) | 0; 0% (0-49,0) | 0; 0% (0-49,0) | 3; 75% (30,1-95,4) | 3; 75% (30,1-95,4) | 3; 75% (30,1-95,4) |
| | PPD-h | | | | | | 0; 0% (0-49,0) |

¹PPD-b: PPD bovina; ²IC Wilson, 95%; ³PPD-h: PPD humana.

Además, en los tres grupos hubo un incremento significativo [test de Friedman, $p=0,02$, $p=0,00$ y $p=0,02$ para los grupos 1 (*M. bovis*), 2 (*M. caprae*) y 3 (*M. tuberculosis*) respectivamente] de los valores de DO obtenidos en el test de detección de IFN- γ realizado con la PPD bovina desde la segunda semana tras la infección. En la Figura 21 se recogen los valores de DO obtenidos por todos los animales incluidos en cada grupo en el test de detección de IFN- γ .

Cuadro de lesiones

El grado de lesiones observado en los animales y el resultado del cultivo microbiológico aparece resumido en la Tabla 23. Se observaron diferencias significativas entre los tres grupos (test mediano de Chi-cuadrado, $p=0,01$). De la puntuación máxima posible de la cavidad torácica (19), el grupo que presentó una puntuación más elevada en cuanto al grado de lesión fue el infectado por *M. bovis*, en el que se observaron lesiones compatibles en cuatro animales con una media de $10,4 \pm 2,09$ y un rango (mínimo-máximo) de 5-13, seguido del grupo de *M. caprae*, con tres animales que presentaron lesiones (media $9,6 \pm 2,95$ y rango de 0-18). En el último lugar se sitúa el grupo de *M. tuberculosis*, ya que únicamente se identificaron lesiones compatibles en un animal, obteniendo valores inferiores a los de los otros (media $0,25 \pm 3,30$ y rango 0-1), indicando que la extensión de las lesiones observadas fue inferior a

las que se desarrollaron en los otros grupos. Además, los cuatro animales que presentaron lesiones en localizaciones distintas de la cavidad torácica pertenecían al grupo 1 (*M. bovis*).

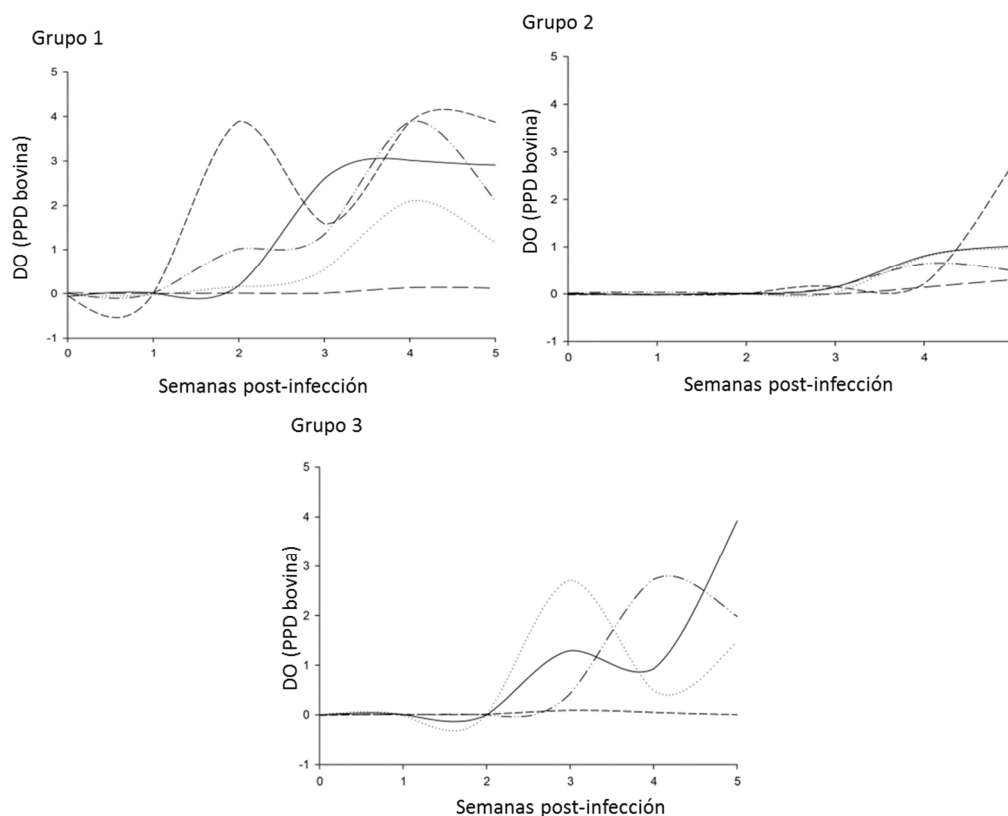


Figura 21. Valores de DO obtenidos en el test de detección de IFN- γ estimulado con la PPD bovina realizado durante todo el estudio en los tres grupos infectados experimentalmente: (grupo 1) *M. bovis*; (grupo 2) *M. caprae*; (grupo 3) *M. tuberculosis*.

Tabla 23. Cuadro de lesiones observado en los tres grupos experimentales incluidos, en todas las regiones anatómicas y en la cavidad torácica (media \pm error estándar: EE) y resultados del cultivo microbiológico en los tres grupos incluidos.

| Grupo | Cuadro de lesiones media \pm EE | Cavidad torácica media \pm EE | Cultivo TBC |
|-------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| G1 <i>M. bovis</i> (n=5) | 15,2 \pm 3,10 (9-19) ¹ | 10,4 \pm 2,09 (5-13) | 5/5; 100% (56,5-100) ² |
| G2 <i>M. caprae</i> (n=5) | 10,8 \pm 3,10 (2-23) | 9,6 \pm 2,95 (0-18) | 3/5; 60,0% (23,1-88,2) |
| G3 <i>M. tuberculosis</i> (n=4) | 3,0 \pm 3,50 (1-6) | 0,25 \pm 3,30 (0-1) | 3/4; 75,0% (30,1-95,4) |

¹Rango (mínimo – máximo); ²IC Wilson, 95%.

3.3.1.3. Resumen

Los resultados obtenidos en el quinto estudio experimental sugieren que existen diferencias en la evolución de la infección, en el desarrollo de lesiones y en el rendimiento de las pruebas diagnósticas para la tuberculosis en el ganado caprino infectado de manera experimental con distintas especies del MTBC. En el presente estudio *M. bovis* y *M. caprae* fueron las especies que provocaron mayor grado de lesiones y mayor respuesta a la IDTB en comparación con *M. tuberculosis*, ya que la sensibilidad y el número de reactores identificados en la IDTB simple y comparada realizada con las PPDs fue superior en estos grupos. Además, la infección producida por *M. bovis* se detectó con el test de detección de IFN- γ una semana antes que cuando se produjo con *M. caprae* y/o *M. tuberculosis*. En el grupo infectado con *M. tuberculosis* tanto la sensibilidad como el número de reactores identificados con la IDTB simple y comparada y el test de detección de IFN- γ fueron superiores cuando ambos se realizaron con la PPD aviar y bovina. Cuando se empleó la PPD humana en ese grupo no hubo ningún positivo con las dos pruebas evaluadas, además, en el test de detección de IFN- γ y tampoco se identificó ningún animal infectado ni ningún reactor en los otros dos grupos infectados. De las tres especies evaluadas, *M. bovis* fue la que produjo lesiones más extensas y en mayor número, y fue el único patógeno que provocó lesiones en otras localizaciones además de la cavidad torácica. A pesar del reducido número de animales analizados, los resultados obtenidos indican que el rendimiento de las pruebas diagnósticas puede verse modificado en función de la especie del MTBC implicada en la infección.

3.4. CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE TUBERCULOSIS EN CAMÉLIDOS DE SUDAMÉRICA (LLAMAS Y ALPACAS)

La tuberculosis en los camélidos, concretamente en los camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas) ha generado mucha atención en los últimos años debido principalmente al creciente empleo de los mismos como animales de compañía y para la producción de fibra en algunos países de Europa y en Estados Unidos. En varios trabajos científicos se ha puesto de manifiesto que ambas especies son altamente susceptibles a la enfermedad, este hecho sugiere una rápida evolución de la misma, y que en ocasiones termina con la muerte del animal de manera súbita. En la actualidad existe limitada información disponible sobre el rendimiento de las pruebas diagnósticas en estas especies, tanto de las de base celular como las de base humoral, debido principalmente al reducido número de animales analizados en situación de infección natural y a la escasez de información documentada en los países de donde estos animales son originarios. Por este motivo, es esencial estudiar diversos protocolos diagnósticos que maximicen la detección de animales infectados (falsos negativos) y minimicen las respuestas positivas en animales sanos (falsos positivos). Además, es de suma importancia el desarrollo de técnicas que no precisen requerimientos logísticos elevados, posibilitando su uso en cualquier situación. La implementación de estas medidas permitirá un mayor control de la enfermedad en los animales, tanto en sus países originales como fuera de ellos. Además, al mejorar el diagnóstico se favorecería el control de la enfermedad en estas especies, permitiendo reducir la potencial transmisión de la tuberculosis de llamas y alpacas a otras especies animales o al hombre, y se obtendrían datos más precisos sobre la prevalencia real de la enfermedad en camélidos.

El capítulo IV engloba dos objetivos específicos centrados en esta hipótesis, cada uno de los cuales ha servido para la realización del sexto y séptimo estudio experimental de la presente tesis doctoral.

3.4.1. Sexto estudio experimental: sensibilidad de la IDTB con distintos protocolos y de un ELISA experimental en alpacas infectadas de forma natural

El sexto estudio experimental se diseñó para valorar la sensibilidad de la IDTB (simple y comparada) y de un ELISA experimental (DR-ELISA) para la detección de Ac en alpacas infectadas de forma natural. La finalidad del estudio fue ampliar el conocimiento existente sobre el rendimiento de la IDTB en estas especies, ya que la mayor parte de los estudios disponibles se han realizado en un número reducido de animales, por lo que los resultados obtenidos no permitían extraer conclusiones definitivas. Además se evaluó el rendimiento del ELISA experimental para el diagnóstico de la enfermedad en estos animales, y de forma complementaria el empleo de las pruebas diagnósticas de base celular y humoral en paralelo. La inoculación de las PPDs se realizó en diversas localizaciones (axilar, pre-escapular y cervical) y la lectura de la prueba se efectuó a distintos tiempos (72 y 120 horas). Las muestras para la realización del ELISA se recogieron antes y después (15, 30 y 42 días) de la inoculación de las PPDs para valorar el posible incremento en el título de Ac específicos frente al MTBC en función del momento de extracción de las muestras. **Este sexto estudio experimental se enmarca dentro del capítulo IV.**

3.4.1.1. Material y métodos

3.4.1.1.1. Población en estudio

Para la realización de este trabajo se seleccionó una explotación de alpacas (*Vicugna pacos*) constituida por dos razas distintas (suri y huacaya), situada en el centro de España en la que el veterinario responsable había observado signos clínicos compatibles con la enfermedad (caquexia, anorexia y dificultad respiratoria) y habían muerto súbitamente tres animales. En la necropsia se observaron lesiones compatibles con tuberculosis y se realizó el cultivo microbiológico confirmando la infección producida por *M. bovis* SB0119. Un mes tras la muerte de los primeros animales se comenzó el estudio. El rebaño se había constituido en el año 2001 a partir de animales importados de Chile y Nueva Zelanda y desde entonces y hasta el inicio del brote no se había registrado ningún antecedente de tuberculosis en el mismo.

Todos los animales incluidos en el estudio tenían una edad entre 1 y 10 años, durante la realización del mismo nacieron cuatro animales que se incluyeron en el último muestreo una vez que fueron mayores de 6 semanas. Anteriormente, nunca se había realizado ninguna prueba para el diagnóstico de la tuberculosis en esta explotación.

3.4.1.1.2. Diseño experimental

Para evaluar la sensibilidad de la IDTB simple y comparada y del ELISA experimental se realizaron tres muestreos consecutivos durante un mismo año: enero, marzo y junio de 2012. En el primer muestreo la IDTB simple y comparada se realizó en la localización axilar, en el segundo muestreo se incluyó también la región pre-escapular y para finalizar en el último se realizó la inoculación de las PPDs de manera adicional en la localización cervical. En todos los muestreos el incremento de espesor del pliegue cutáneo se registró a las 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs y se respetó un periodo mínimo de 42 días entre cada uno de ellos. La prueba serológica se realizó con muestras de suero obtenidas antes de realizar la IDTB en un total de 75 animales, y a distintos tiempos tras la realización de la misma en 71 animales (en 25 se recogió el suero 15 días tras la IDTB, en 39 animales se recogió el suero 30 días tras la IDTB y en 7 se realizó la prueba serológica con muestras obtenidas 42 días tras la IDTB). El número de animales incluidos en cada muestreo y las pruebas realizadas aparecen detallados en la Tabla 24.

En el primer muestro (enero), la prueba simple y comparada se efectuaron en la localización axilar en todos los animales presentes en la explotación (n=108). Un animal murió antes de realizar la lectura de la IDTB a las 120 horas. Respecto a la prueba serológica, se recogieron muestras de suero de 18 animales antes de la IDTB, 11 de los cuales se muestrearon de nuevo 15 días tras la IDTB y en los 7 restantes la recogida del suero se realizó 42 días tras efectuar la IDTB (Tabla 24). Una vez terminado el primer muestreo, se sacrificaron 18 animales, de los cuales 10 habían sido positivos, 4 negativos y 4 dudosos a la IDTB. Por motivos relacionados con el manejo, los 18 animales se sacrificaron en dos tandas. Once animales se sacrificaron 15 días tras la realización de la IDTB y los 7 restantes 42 días tras haber inoculado las PPDs. De todos ellos se cogieron muestras de tejido para realizar el cultivo microbiológico.

En el segundo muestreo (marzo), la IDTB simple se realizó en la localización axilar en 65 animales y en la zona pre-escapular en 48 de ellos, mientras que la prueba comparada se realizó en 65 y 23 animales respectivamente (Tabla 24). Treinta días después del muestreo se sacrificaron 39 animales, de los cuales 14 habían sido positivos, 9 negativos y 16 dudosos a la IDTB, de todos ellos se recogió suero antes y 30 días después de realizar la inoculación de las PPDs además de muestras de tejido para realizar el cultivo microbiológico.

Por último, en el tercer muestreo (junio), la IDTB (tanto simple como comparada) axilar y pre-escapular se efectuó en 18 animales (uno murió tras la inoculación de las PPDs, por este motivo la lectura de la prueba se realizó únicamente en 17 animales), mientras que la IDTB simple y comparada en la zona cervical se realizó en 13 animales. Las muestras de suero de los 18 animales se recogieron antes de la IDTB y 14 de ellos se muestrearon de nuevo 15 días después de la prueba (durante ese periodo murieron 4 animales). Para finalizar,

se sacrificaron los animales que habían sido positivos a la prueba IDTB (10 animales), de los cuales se cogieron muestras para realizar el cultivo microbiológico.

Debido a que tras cada muestreo no se sacrificó la totalidad de animales reactivos a las pruebas diagnósticas evaluadas, los animales se mantuvieron en la explotación de origen bajo condiciones de bioseguridad (acceso de personal limitado y uso obligatorio de EPIs desechables para la manipulación de los animales) con las autorizaciones pertinentes de acuerdo a la normativa nacional (Real Decreto 53/2013). Durante la realización del estudio murieron 33 animales, 25 entre el primer y el segundo muestreo y 8 entre el segundo y el tercero.

Tabla 24. Animales incluidos y pruebas diagnósticas realizadas en cada uno de los muestreos. En el primero (enero), la IDTB se realizó en la localización axilar, en el segundo (marzo) en localización axilar y la pre-escapular y en el último (junio) se incluyó también la zona cervical. En cada muestreo la interpretación de la IDTB se realizó 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs.

| Muestreo | IDTB | | | Serología (n) | Sacrificio (n) |
|-----------------|-----------------|----------------------|------------------|---------------|----------------|
| | Lectura (horas) | Lugar de inoculación | Animales | | |
| Primero (n=108) | IDTB* | 72 | 108 | 18 | 18 |
| | | 120 | 107 ¹ | | |
| | IDTBC* | 72 | 108 | | |
| | | 120 | 107 | | |
| Segundo (n=65) | IDTB | 72 | 64 | 39 | 39 |
| | | 120 | 65 ² | | |
| | | 72 | 48 | | |
| | | 120 | 48 | | |
| | IDTBC | 72 | 64 | | |
| | | 120 | 65 | | |
| | | 72 | 23 | | |
| | | 120 | 23 | | |
| Tercero (n=18) | IDTB | 72 | 17 | 18 | 10 |
| | | 120 | 17 | | |
| | | 72 | 17 | | |
| | | 120 | 17 | | |
| | | 72 | 13 | | |
| | | 120 | 13 | | |
| | IDTBC | 72 | 17 | | |
| | | 120 | 17 | | |
| | | 72 | 17 | | |
| | | 120 | 17 | | |
| | | 72 | 13 | | |
| | | 120 | 13 | | |

*IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada; ¹La lectura a las 120 horas se realizó en 107 animales porque un animal murió antes de la misma; ²hubo un animal en el que no se realizó la lectura de la IDTB a las 72 horas.

IDTB simple y comparada

Para la realización de la IDTB se efectuaron simultáneamente dos inoculaciones de 0,1 ml cada una de PPD aviar (0,5 mg/ml, 2.500 IU, lado derecho) y PPD bovina (1 mg/ml, 2.500 IU, lado izquierdo) en la localización axilar (en todos los muestreos realizados). En el

segundo y tercer muestreo, la PPD bovina se inoculó también en la región pre-escapular, y en el tercer muestreo la PPD bovina también se inoculó (además de en las otras dos localizaciones) en la región cervical. Se emplearon las PPDs utilizadas de rutina en ganado bovino y caprino (CZ Veterinaria, España).

Para valorar el rendimiento de la prueba simple y comparada se consideraron las dos interpretaciones disponibles (estándar y severa, Anexo I). En la Figura 22 se muestran las localizaciones empleadas para realizar la prueba de la IDTB en el presente estudio.



Figura 22. Localizaciones seleccionadas para realizar la prueba IDTB en el presente estudio: axilar (imagen superior izquierda), pre-escapular (imagen superior derecha) y cervical (imagen inferior).

Prueba serológica

Para este trabajo se empleó una prueba serológica experimental desarrollada por Inmunología y Genética Aplicada S.A. (INGENASA, España) basada en la detección de Ac frente al antígeno MPB83 de *M. bovis*, denominada ELISA de doble reconocimiento (DR-ELISA). Lo novedoso de esta técnica es que permite la detección de animales infectados recientemente, ya que el antígeno está presente tanto tapizando la placa como en el conjugado, por lo que además de la IgG se reconocen otras inmunoglobulinas como la IgM (Venteo *et al.*, 2012), para la realización del estudio se empleó la dilución 1:25 de las muestras.

De forma resumida, una vez que los Ac presentes en la muestra se han unido al antígeno inmovilizado en la placa, se añade el conjugado constituido por el antígeno MPB83

unido a una enzima que está marcada, y en presencia de un sustrato se genera una reacción cuantificable en un espectrofotómetro. Para la realización del protocolo e interpretación de la prueba se siguieron las recomendaciones del fabricante, para el cálculo del resultado se empleó el valor de la DO obtenida con una longitud de onda de 450 nanómetros (DO_{450}) clasificando una muestra:

- positiva cuando el valor de la DO_{450} fue superior a 0,35.
- dudosa cuando la DO_{450} fue igual o superior a 0,30.

Cultivo microbiológico

Los animales sacrificados al finalizar cada muestreo, un total de 67 (18 tras el primero, 39 tras el segundo y 10 tras el tercero), se sometieron a una necropsia detallada en una planta de recogida de residuos animales, realizando la observación macroscópica para identificar lesiones compatibles con tuberculosis. Además, del total de animales que murieron en la explotación a lo largo del estudio, en 7 de ellos también se realizó una necropsia completa. Se tomaron muestras de diferentes tejidos y de lesiones compatibles con tuberculosis) de todos los animales en los cuales se realizó un examen post-mortem ($67+7=74$) para la posterior realización del cultivo microbiológico (primer estudio experimental).

3.4.1.1.3. Análisis estadístico

Debido a que la proporción de animales sacrificados (positivos, negativos y dudosos) no fue equitativa (únicamente se sacrificó una pequeña proporción de animales negativos a los dos test diagnósticos evaluados), los resultados obtenidos se emplearon para calcular la proporción de animales positivos a cada test diagnóstico (T+) sobre aquellos en los que se confirmó la infección (cultivo positivo y/o presencia de lesiones compatibles, C+), denominándolo valor T+/C+, el cual se relaciona directamente con la sensibilidad de cada test analizado.

Los intervalos de confianza (IC) del 95% se obtuvieron mediante el test de Fisher analizando los datos con el programa *Win Pepi* [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35]. La normalidad de los datos y la correlación entre el incremento de espesor cutáneo (mm), la localización de la inoculación de las PPDs (axilar, pre-escapular o cervical), y la lectura de la prueba (72 y 120 horas) se analizaron con el test de Mann–Whitney mediante el programa SPSS (V.20 IBM Inc., Chicago, IL, USA). El test de Mann–Whitney se empleó también para analizar la posible diferencia entre la DO (valor cuantitativo) obtenida con el DR-ELISA entre muestreos sucesivos, mientras que para evaluar este parámetro sobre muestras obtenidas antes y después de la IDTB en un mismo muestreo, se empleó el test de Wilcoxon, analizando los datos en el programa SPSS.

3.4.1.2. Resultados

En primer lugar se presentan los resultados obtenidos en cada muestreo realizado con las pruebas de base celular y humoral de manera independiente y en paralelo, y en segundo lugar el análisis de la respuesta de base humoral realizada con muestras obtenidas antes y después de la inoculación de las PPDs.

Resultados obtenidos de manera independiente (IDTB simple y comparada y DR-ELISA) y en paralelo en cada uno los tres muestreos realizados

En **el primer muestreo**, cuando la lectura de la IDTB simple realizada en localización axilar se efectuó a las 72 horas, fueron positivos 32 animales (interpretación estándar) y 47 animales (interpretación severa). El incremento del espesor del pliegue cutáneo (medido en mm) 72 horas tras la inoculación de la PPD bovina osciló entre 0-14 (mediana 2). Además, en una proporción elevada de animales se observó edema y/o dolor cuando se realizó la lectura de la IDTB simple, en los cuales el incremento de espesor del pliegue cutáneo fue superior a 3 mm. El valor T+/C+ de la IDTB simple analizada con la interpretación estándar y la lectura a 72 horas fue 37,5% (IC 95%, 15,2–64,6) y con la interpretación severa aumentó a 56,2% (IC 95%, 29,9-80,2), disminuyendo cuando la lectura se realizó a las 120 horas tanto con la interpretación estándar [31,2% (IC 95%, 11-58,7)] como con la interpretación severa [50% (IC 95% 24,7-75,3)]. Cuando la lectura de la IDTB simple se realizó 120 horas tras la inoculación de la PPD bovina, el incremento del espesor del pliegue cutáneo varió entre 1-15 (mediana 3). Los resultados obtenidos con la IDTB simple y comparada en el primer muestreo se detallan en la Tabla 25. La IDTB comparada (interpretación severa y lectura a las 72 horas) obtuvo un valor T+/C+ de 37,5% (IC 95%, 15,2–64,6), incrementándose con la lectura tras 120 horas a 43,7% (IC 95%, 19,8–70,1) con la misma interpretación. Con la interpretación estándar la IDTB comparada alcanzó un valor T+/C+ de 0% y 6,25% (lectura tras 72 y 120 horas respectivamente) (Tabla 25).

Tabla 25. Proporción de reactores y valor T+/C+ obtenidos empleando la IDTB en la localización axilar con la lectura realizada a 72 y 120 horas en el primer muestreo.

| IDTB | | Interpretación Estándar | | Interpretación Severa | |
|-----------------|-----|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Lectura (horas) | | Reactores/TBC ¹ | T+/C+ | Reactores/TBC | T+/C+ |
| IDTB* | 72 | 6/16 | 37,5% (15,2-64,6) ² | 9/16 | 56,2% (29,9-80,2) |
| | 120 | 5/16 | 31,2% (11-58,7) | 8/16 | 50% (24,7-75,3) |
| IDTBC* | 72 | 0/16 | 0% (0-20,6) | 6/16 | 37,5% (15,2-64,6) |
| | 120 | 1/16 | 6,25% (2-30,2) | 7/16 | 43,7% (19,8-70,1) |

¹Animales en los que se confirmó la infección; ²IC Fisher, 95%; *IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada.

Tras el primer muestreo se sacrificaron 18 animales, de los cuales se confirmó la infección en 16, de todos ellos se recogieron muestras de suero antes de la IDTB simple y comparada. De las 18 muestras, el DR-ELISA detectó tres positivas (16,7%, IC 95%, 35,8-41,4) y sobre los 16 animales infectados el valor T+/C+ fue 18,7% (IC 95%, 4-45,6), con muestras obtenidas antes de la inoculación de las PPDs. Empleando muestras recogidas 15 días después de la IDTB simple y comparada, el ELISA detectó 10 (90,9%, IC 95%, 58,7-99,8) de los 11 animales analizados, sobre los cuales se confirmó la infección en nueve alpacas. Con muestras obtenidas 15 días tras la inoculación de las PPDs el DR-ELISA detectó ocho de los nueve animales infectados, siendo su valor T+/C+ de 88,9% (IC 95%, 51,8-99,7) e identificando además cinco animales negativos a la IDTB simple con mayor valor T+/C+ (prueba simple y lectura a las 72 horas). Cuando el análisis se realizó con muestras recogidas 42 días tras la IDTB (siete animales en los que se confirmó la infección), el DR-ELISA clasificó 2 (28,6%, IC 95%, 36,7-71,0) como positivos y su valor T+/C+ fue 28,6%, uno de ellos había sido también reactor con el suero obtenido antes de realizar la IDTB simple y comparada.

En el **segundo muestreo**, con la IDTB simple realizada en la zona axilar e interpretada a las 72 horas, hubo 12 reactores (interpretación estándar) y 24 reactores (interpretación severa) sobre el total de animales analizados. Los resultados obtenidos con la IDTB simple y comparada en el segundo muestreo se detallan en la Tabla 26.

El incremento del espesor del pliegue cutáneo tras la inoculación de la PPD bovina varió entre 0-8 (mediana 2) en la localización axilar, siendo idéntico al obtenido en la localización pre-escapular. Al interpretar la IDTB simple en la localización axilar 120 horas tras la inoculación de las PPDs, el número de reactores disminuyó a cinco (interpretación estándar) y ocho (interpretación severa) y el incremento del espesor del pliegue cutáneo osciló entre 0-10 (mediana 1).

Tabla 26. Proporción de reactores y valor T+/C+ obtenidos empleando la IDTB en distintas localizaciones (axilar y pre-escapular) y con la lectura realizada a las 72 y 120 horas en el segundo muestreo.

| IDTB | | | Interpretación Estándar | | Interpretación Severa | |
|-----------------|-----|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Lectura (horas) | | Localización | Reactores/ TBC ¹ | T+/C+ | Reactores/ TBC | T+/C+ |
| IDTB* | 72 | Axilar | 10/39 | 25,6% (13,0-42,1) ² | 21/39 | 53,8% (37,2-69,9) |
| | 120 | | 5/39 | 12,8% (4,3-27,4) | 8/39 | 20,5% (9,3-36,5) |
| | 72 | Pre-escapular | 10/36 | 27,8% (14,2-45,2) | 21/36 | 58,3% (40,8-74,5) |
| | 120 | | 3/36 | 8,3% (1,8-22,5) | 6/36 | 16,6% (6,4-32,8) |
| IDTBC* | 72 | Axilar | 2/39 | 5,1% (0,6-17,3) | 21/39 | 53,8% (37,2-69,9) |
| | 120 | | 2/39 | 5,1% (0,6-17,3) | 8/39 | 20,5% (9,3-36,5) |
| | 72 | Pre-escapular | 1/13 | 4,3% (0,2-36) | 6/13 | 46,1% (19,2-74,9) |
| | 120 | | 0/13 | 0% (0-14,8) | 3/13 | 23,1% (5,0-53,8) |

¹Animales en los que se confirmó la infección; ²IC Fisher, 95%; *IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada.

El valor T+/C+ más elevado de la IDTB simple en la localización axilar fue 53,8% (IC 95%, 37,2-69,9) (interpretación severa y lectura tras 72 horas), mientras que cuando se empleó la interpretación estándar el valor disminuyó a 25,6% (IC 95% 13,0-42,1). El mismo resultado T+/C+ se obtuvo con la IDTB comparada (interpretación severa y lectura a las 72 horas). Sin embargo, al aplicar la interpretación estándar la disminución del valor T+/C+ fue mayor (5,1%, IC 95%, 0,6-17,3), ya que únicamente cuatro animales tuvieron una diferencia entre el incremento de espesor del pliegue cutáneo superior en 4 mm entre la PPD bovina y la aviar (Tabla 26).

La localización pre-escapular no es la elegida de rutina para realizar la IDTB simple en alpacas, sin embargo los resultados del segundo muestreo ponen de manifiesto que el valor T+/C+ obtenido en esta zona fue similar 16,6% contra 20,5% (lectura tras 120 horas, interpretación severa) e incluso superior (58,3% frente a 53,8% (lectura tras 72 horas, interpretación severa) al alcanzado en la localización axilar. Sin embargo el valor T+/C+ de la IDTB comparada siempre fue superior en la localización axilar respecto al alcanzado en la región pre-escapular.

Todos los animales incluidos en el segundo muestreo habían sido analizados también en el primero. De los 24 reactores detectados en el segundo muestreo (IDTB simple, interpretación severa y lectura tras 72 horas en la localización axilar), 17 habían sido positivos en el primero. Además, hubo 11 animales positivos en el primer muestreo que en el segundo fueron negativos (IDTB simple axilar y lectura a las 72 horas), de los cuales, cinco fueron reactores cuando la lectura de la IDTB simple axilar se realizó a las 120 horas y también

cuando la IDTB simple se efectuó en la región pre-escapular (independientemente del momento de la lectura).

En el segundo muestreo se analizaron 39 sueros con el DR-ELISA recogidos inmediatamente antes y 30 días tras la inoculación de las PPDs, de los cuales se confirmó la infección en todos ellos. Con esta prueba, 14 animales se clasificaron como positivos y 3 como dudosos empleando las muestras de suero obtenidas antes de la IDTB. Considerando las 3 muestras dudosas como positivas, el valor T+/C+ del DR-ELISA realizado con muestras obtenidas antes de la IDTB simple y comparada fue 43,6% (IC 95%, 27,8–60,4), mientras que con las muestras recogidas 30 días tras efectuar la IDTB simple y comparada, el valor T+/C+ se incrementó a 76,9% (IC 95%, 60,7–88,9), ya que el ELISA identificó correctamente 30 de los 39 animales infectados.

En el **tercer muestreo**, el valor T+/C+ más elevado con la IDTB simple, interpretación severa y realizando la lectura a las 72 horas se obtuvo en la región pre-escapular [8 reactores (80%, IC 95%, 44,4-97,5)] comparado con las localizaciones axilar y cervical [6 reactores identificados en cada una de ellas (60%, IC 95%, 26,2-87,8)]. El incremento del espesor del pliegue cutáneo de la IDTB simple interpretada tras 72 horas, en la zona axilar fue 0-6 (mediana 1), en la zona pre-escapular fue 0-18 (mediana 3) y en la zona cervical 0-8 (mediana 2). Cuando la IDTB simple (lectura 72 horas tras la inoculación) se analizó empleando la interpretación estándar, el valor T+/C+ obtenido fue idéntico en las tres localizaciones (identificándose cinco reactores en cada una de ellas) y menor al alcanzado con la interpretación severa. El mayor valor T+/C+ con la IDTB simple (lectura tras 120 horas e interpretación severa) se obtuvo en la localización pre-escapular [7 reactores (70%, IC 95%, 34,8-93,3)], seguido de la axilar [6 positivos (60%, IC 95%, 26,2-87,8)] y de la cervical [5 positivos (50%, IC 95% 18,7-81,3)]. Los resultados obtenidos en el tercer muestreo con la IDTB simple y comparada se detallan en la Tabla 27.

El incremento de espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD bovina osciló entre 1-7 (mediana 2) en la zona axilar, entre 1-11 (mediana 4) en la zona pre-escapular y entre 1-7 (mediana 4) en la zona cervical (lectura a las 120 horas). Además, el incremento de espesor del pliegue cutáneo tras la inoculación de la PPD bovina, fue significativamente superior (test de Mann–Whitney, $p < 0,05$) en la localización pre-escapular cuando la lectura de la IDTB se realizó a las 120 horas comparado con el obtenido a las 72 horas (resultados no mostrados).

La IDTB comparada detectó una menor proporción de animales infectados que la prueba simple, siendo más evidente al realizar la lectura a las 120 horas y con la interpretación estándar. Cuando se empleó la IDTB comparada con interpretación severa, los mayores valores T+/C+ se obtuvieron en la localización pre-escapular interpretando a las 72 horas y axilar interpretando a las 120 horas (Tabla 27).

Tabla 27. Proporción de reactores y valor T+/C+ obtenidos empleando la IDTB en distintas localizaciones (axilar, pre-escapular y cervical) y con la lectura efectuada a 72 y 120 horas en el tercer muestreo.

| IDTB | | Interpretación Estándar | | Interpretación Severa | |
|-----------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Lectura (horas) | Localización | Reactores/ TBC ² | T+/C+ | Reactores/ TBC | T+/C+ |
| IDTB* | 72 | Axilar | 5/10 50% (18,7-81,3) ³ | 6/10 | 60% (26,2-87,8) |
| | 120 | | 5/10 50% (18,7-81,3) | 6/10 | 60% (26,2-87,8) |
| | 72 | Pre-escapular | 5/10 50% (18,7-81,3) | 8/10 | 80% (44,4-97,5) |
| | 120 | | 3/10 30% (6,7-65,2) | 7/10 | 70% (34,8-93,3) |
| | 72 | Cervical | 5/10 50% (18,7-81,3) | 6/10 | 60% (26,2-87,8) |
| | 120 | | 2/10 20% (2,5-55,6) | 5/10 | 50% (18,7-81,3) |
| IDTBC* | 72 | Axilar | 1/10 10% (0,3-44,5) | 5/10 | 50% (18,7-81,3) |
| | 120 | | 1/10 10% (0,3-44,5) | 6/10 | 60% (26,2-87,8) |
| | 72 | Pre-escapular | 3/10 30% (6,7-65,2) | 6/10 | 60% (26,2-87,8) |
| | 120 | | 3/10 30% (6,7-65,2) | 5/10 | 50% (18,7-81,3) |
| | 72 | Cervical | 2/10 20% (2,5-55,6) | 4/10 | 40% (12,2-73,8) |
| | 120 | | 1/10 10% (0,3-44,5) | 5/10 | 50% (18,7-81,3) |

¹Animales en los que se confirmó la infección; ²IC Fisher, 95%; *IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada.

Cuatro de los 18 animales analizados en el tercer muestreo eran crías que no se habían muestreado previamente ya que nacieron entre el segundo y el tercer muestreo. Los 14 animales restantes se habían analizado en los dos muestreos anteriores, siendo siempre dudosos o negativos, excepto un animal que fue positivo en el segundo muestreo y que murió antes de realizar el tercer y último muestreo.

En el tercer muestreo se analizaron 18 sueros con el DR-ELISA obtenidos antes de realizar la inoculación de las PPDs, de los 18 animales se realizó el cultivo microbiológico en 10, confirmándose en todos la infección. Cuando el ELISA se realizó con muestras recogidas antes de la IDTB simple y comparada hubo 12 positivos de los 18 analizados (66,7%, IC 95%, 41,0-86,7) con un valor T+/C+ de 80% (IC 95%, 44,4-97,5), ya que se identificaron correctamente ocho de los 10 infectados. Catorce animales se muestrearon de nuevo 15 días tras realizar la IDTB, detectándose 10 (71,4%, IC 95% 41,9-91,6), siendo el valor T+/C+ 100% (IC 95%, 69,2-100) ya que el DR-ELISA identificó correctamente todos los animales infectados. Además, se identificaron dos animales negativos a la IDTB simple con el mayor valor T+/C+ (interpretación severa, localización pre-escapular y lectura a las 72 horas).

Con el fin de determinar la combinación más eficiente para maximizar la detección de animales infectados, se analizaron los resultados obtenidos con las dos técnicas evaluadas en paralelo (Tabla 28). En los tres muestreos el rendimiento de ambas pruebas empleadas en paralelo fue superior cuando el DR-ELISA se realizó con muestras obtenidas tras la inoculación de las PPDs. En el primer muestreo, el empleo en paralelo de la IDTB simple (lectura realizada tras 72 o 120 horas) y la prueba serológica detectó la totalidad de animales infectados [valor T+/C+ 100% (IC 95%, 66,4–100)], superior al alcanzado con las dos pruebas realizadas individualmente. En el segundo muestreo, el empleo en paralelo del DR-ELISA y la IDTB simple realizada en la localización pre-escapular y lectura a las 72 horas, obtuvo un valor T+/C+ de 94,4% (95% CI, 81,3–99,3), superior al alcanzado con cada prueba individualmente. Empleando la misma interpretación de la IDTB simple realizada en la localización axilar, el valor T+/C+ obtenido habría sido de 92,3% (IC 95%, 79,1–98,4), de nuevo superior al obtenido con cada prueba. En el tercer muestreo, se detectó la totalidad de animales infectados independientemente de la localización y de la lectura de la IDTB simple cuando el DR-ELISA se realizó con muestras obtenidas 15 días tras la realización de la IDTB.

Tabla 28. Resultados obtenidos en los tres muestreos incluidos en el presente estudio empleando la IDTB simple (interpretación severa) en distintas localizaciones y con la lectura efectuada a 72 y 120 horas, y el DR-ELISA realizado con muestras obtenidas pre y post-IDTB en paralelo.

| | IDTB | Lectura (horas) | Serología | Reactores/ TBC ¹ | T+/C+ |
|--------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| Primer Muestreo * | IDTB axilar | 72 | Pre-IDTB | 11/16 | 68,7% (41,3-89) ² |
| | | | 15 ³ | 9/9 | 100% (66,4-100) |
| | | 120 | Pre-IDTB | 11/16 | 68,7% (41,3-89,9) |
| | | | 15 | 9/9 | 100% (66,4-100) |
| Segundo muestreo | IDTB axilar | 72 | Pre-IDTB | 29/39 | 74,4% (57,8-86,9) |
| | | | 30 ⁴ | 36/39 | 92,3% (79,1-98,4) |
| | | 120 | Pre-IDTB | 22/39 | 56,4% (39,6-72,2) |
| | | | 30 | 32/39 | 82,1% (66,5-92,5) |
| | IDTB pre-escapular | 72 | Pre-IDTB | 26/36 | 72,2% (54,8-85,8) |
| | | | 30 | 34/36 | 94,4% (81,3-99,3) |
| | | 120 | Pre-IDTB | 19/36 | 52,8% (35,5-69,6) |
| | | | 30 | 30/36 | 83,3% (67,2-93,6) |
| Tercer muestreo | IDTB axilar | 72 | Pre-IDTB | 9/10 | 90% (55,5-99,7) |
| | | | 15 | 10/10 | 100% (69,2-100) |
| | | 120 | Pre-IDTB | 8/10 | 80% (44,4-97,5) |
| | | | 15 | 10/10 | 100% (69,2-100) |
| | IDTB pre-escapular | 72 | Pre-IDTB | 9/10 | 90% (55,5-99,7) |
| | | | 15 | 10/10 | 100% (69,2-100) |
| | | 120 | Pre-IDTB | 8/10 | 80% (44,4-97,5) |
| | | | 15 | 10/10 | 100% (69,2-100) |
| | IDTB cervical | 72 | Pre-IDTB | 8/10 | 80% (44,4-97,5) |
| | | | 15 | 10/10 | 100% (69,2-100) |
| | | 120 | Pre-IDTB | 8/10 | 80% (44,4-97,5) |
| | | | 15 | 10/10 | 100% (69,2-100) |

¹Animales en los que se confirmó la infección; ²IC Fisher, 95%; ³Muestras extraídas 15 días post-IDTB; ⁴Muestras extraídas 30 días post-IDTB; *No se incluyeron las muestras obtenidas 42 días tras la IDTB por el limitado número de animales (n=7).

Incremento en el título de Ac específicos frente al MTBC antes y después de la inoculación de las PPDs

En el presente estudio se evaluó si la inoculación de las PPDs incrementaba la respuesta frente al DR-ELISA (denominado efecto *booster*). En la Figura 23 se representa el valor de DO obtenido con el ELISA frente Ac de *M. bovis* en los 16 animales en los que se confirmó la infección de los 18 sacrificados tras el primer muestreo. En el primer muestreo el DR-ELISA se realizó con muestras obtenidas antes de la IDTB (n=16), 15 días tras la IDTB (n=9) y 42 días tras la IDTB (n=7). Los valores de DO más elevados se obtuvieron con las muestras extraídas 15 días tras la IDTB, siendo la mediana 0,66 (IQR 0,25-2,77), comparado con los valores de DO alcanzados con muestras obtenidas antes de efectuar la IDTB, en los que el valor de la mediana fue 0,15 (IQR 0,12-0,23). Sin embargo, cuando el suero se recogió 42 días tras la IDTB, la mediana fue 0,11 (IQR 0,08-1,23), menor a la calculada con las muestras obtenidas 15 días tras la IDTB. Los valores (DO) alcanzados 15 días tras la IDTB, fueron significativamente superiores (test de Wilcoxon, $p < 0,05$) a los alcanzados cuando el ELISA se realizó con muestras recogidas antes de inocular las PPDs.

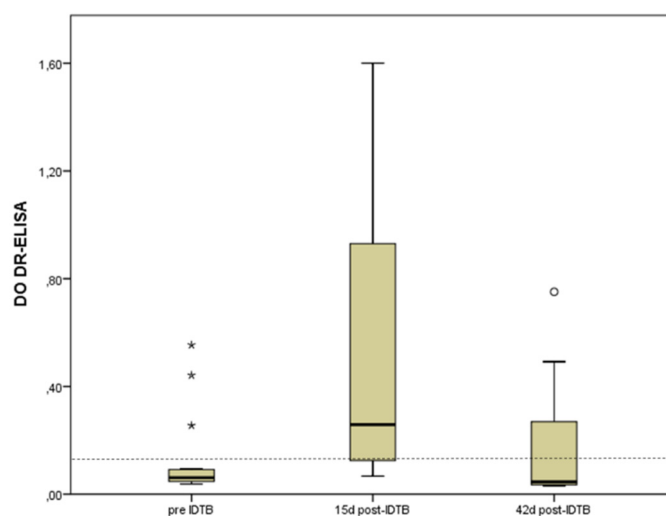


Figura 23. Valores de DO (450 nm) del DR-ELISA en el primer muestreo con los animales infectados (n=16). Suero obtenido pre-IDTB (n=16), 15d post-IDTB (n=9) y 42d post-IDTB (n=7). La línea de puntos representa el punto de corte (0,35). Los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.

En el segundo muestreo se incluyeron muestras de los 39 animales sacrificados obtenidas antes y 30 días tras la inoculación de las PPDs ya que en todos se confirmó la infección, en la Figura 24 se representan los valores de DO. Los valores fueron más altos se alcanzaron con las muestras extraídas tras efectuar la IDTB [mediana 0,69 (IQR 0,21-1,90)] comparado con aquellas recogidas antes de inocular las PPDs [disminuyendo la mediana a 0,28 (IQR 0,13-0,48)], siendo significativamente superiores (test de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Además, los valores de DO obtenidos antes de realizar la IDTB en el segundo muestreo fueron superiores a los observados en las mismas condiciones en el primer muestreo.

Por último, en el tercer muestreo, se incluyeron los 10 animales sacrificados ya que en todos se confirmó la infección. El DR-ELISA se realizó con todas las muestras obtenidas antes y 15 días tras la realización de la IDTB. A pesar del limitado número de animales, los valores de DO más elevados se obtuvieron con las muestras extraídas 15 días tras la inoculación de las PPDs, siendo significativamente superiores (test de Wilcoxon, $p < 0,05$), ya que el valor de la mediana fue 3,54 (IQR 3,21-3,57), comparado con los valores de DO obtenidos antes de realizar la IDTB, siendo la mediana 0,69 (IQR 0,43-3,27).

Igualmente, se observó que el valor de DO del ELISA efectuado con muestras obtenidas antes de realizar la IDTB en el tercer muestreo (mediana 0,69) fue superior al observado en el primer (mediana 0,15) y segundo muestreo (mediana 0,28), cuando en cada uno de ellos el DR-ELISA se realizó con muestras recogidas antes de inocular las PPDs. Siendo significativamente superior (test de Mann–Whitney, $p = 0,003$) el valor (DO) alcanzado en el tercer muestreo respecto al obtenido en el primer muestreo, y a su vez, al comparar el tercer y el segundo muestreo (test de Mann–Whitney, $p = 0,011$).

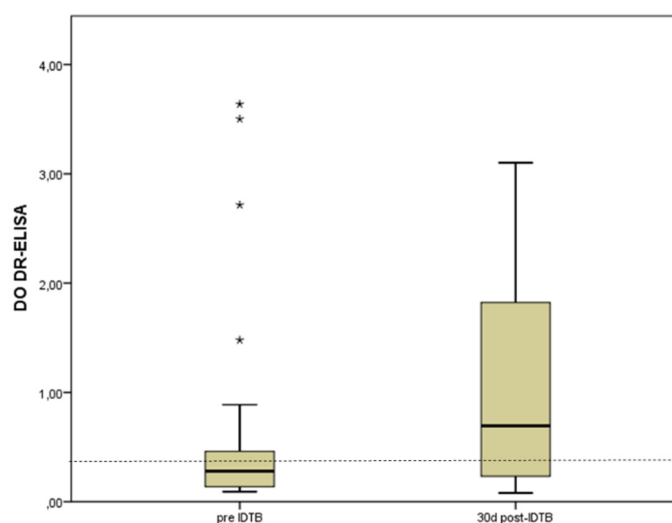


Figura 24. Valores de DO (450 nm) del DR-ELISA en el segundo muestreo con los animales infectados ($n=39$). Suero obtenido pre-IDTB y 30d post-IDTB ($n=39$). La línea de puntos representa el punto de corte (0,35). Los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.

3.4.1.3. Resumen

Los resultados obtenidos en sexto estudio experimental demuestran que la localización en la que se realice la IDTB simple (axilar, pre-escapular o cervical) no afecta a la sensibilidad de la misma, ya que no se observaron diferencias significativas en la proporción

de animales infectados detectados. Es destacable que en la mayoría de los animales positivos a la IDTB simple en los que el incremento de espesor cutáneo fue superior a 3 mm, se observó también la presencia de signos clínicos (edema subcutáneo y dolor) en el punto de inoculación, siendo estos más evidentes cuando la lectura se realizó a las 72 horas que a las 120. Además, en dos de los tres muestreos realizados la sensibilidad de la IDTB simple fue superior efectuando la lectura de la misma a las 72 horas. Al igual que se ha descrito para otras especies, la IDTB comparada fue menos sensible que la IDTB simple. La sensibilidad del ELISA experimental para la detección de Ac fue limitada cuando se realizó con muestras obtenidas antes de la IDTB simple y comparada, incrementándose cuando este se realizó con sueros obtenidos 15 y 30 días tras la inoculación de las PPDs, detectando en el último muestreo la totalidad de animales infectados. Este incremento en la sensibilidad de las pruebas de base humoral tras la inoculación de las PPDs (denominado efecto *booster*) se ha descrito también en ganado bovino y caprino en trabajos en los que se emplearon técnicas serológicas distintas a la evaluada en este estudio. Asimismo, el empleo de las pruebas de base celular y humoral (realizadas estas últimas con muestras obtenidas tras la inoculación de las PPDs) en paralelo fue el único protocolo con el que se logró detectar la totalidad de los animales infectados, sugiriendo que este protocolo de aplicación podría ser la mejor opción en rebaños infectados, tal y como se ha descrito en casos puntuales en otras especies domésticas.

3.4.2. Séptimo estudio experimental: especificidad de la IDTB con distintos protocolos y de un ELISA experimental en llamas y alpacas libres de tuberculosis en su hábitat natural

El séptimo estudio experimental se diseñó para valorar la especificidad de la IDTB (simple y comparada) y de un ELISA para la detección de Ac en fase experimental (DR-ELISA), en llamas y alpacas libres de tuberculosis. La finalidad del estudio fue valorar la especificidad de las dos pruebas diagnósticas en llamas y alpacas bajo sus condiciones de origen, ya que apenas existe información disponible al respecto. La inoculación de las PPDs se realizó en distintas localizaciones (axilar, pre-escapular y cervical) y la lectura de la prueba se efectuó en varios tiempos (72 y 120 horas) tras la IDTB simple y comparada. El DR-ELISA se realizó con muestras obtenidas antes (72 horas) y después (120 horas) de inocular las PPDs, para determinar si en ausencia de infección la inoculación de las PPDs produce un incremento en el título de Ac específicos frente al MTBC. **Este séptimo estudio experimental se enmarca dentro del capítulo IV.**

3.4.2.1. Material y métodos

3.4.2.1.1. Población en estudio

Inicialmente, el presente trabajo se diseñó sobre un mayor número de explotaciones de camélidos de Sudamérica, pero hubo una gran dificultad para localizar explotaciones accesibles así como ganaderos colaboradores. Finalmente, gracias a un proyecto de la Universidad Complutense de Madrid fue posible contactar con la Universidad Nacional de San Marcos (Lima) y poder definir el presente trabajo. Para la realización del mismo se dispuso de dos explotaciones.

La primera (explotación 1) estaba formada por 120 alpacas (*Vicugna pacos*), localizada a 4.000 metros de altitud en La Libertad, una región del noroeste de Perú. La segunda (explotación 2), contaba con 40 llamas (*Lama glama*), situada a 4.200 metros de altitud en Puno, una región del sureste de Perú.

Todos los animales incluidos en el estudio eran mayores de 6 semanas y nunca se les había realizado ninguna prueba para el diagnóstico de la tuberculosis. Además, es importante destacar que en ninguna de las dos explotaciones se habían detectado animales con signos clínicos compatibles con tuberculosis previamente a la realización del trabajo. Debido al elevado valor económico de los animales incluidos en el estudio no fue posible sacrificarlos una vez finalizado el muestreo. Los ganaderos de las dos explotaciones que participaron en el mismo se comprometieron a realizar un seguimiento de los animales muestreados e informar si tras el estudio observaban en algún animal signos clínicos compatibles con tuberculosis o si se producía alguna baja (muertes súbitas, etc.).

3.4.2.1.2. Diseño experimental

Para evaluar la especificidad de las dos técnicas diagnósticas incluidas, se realizó la IDTB simple y comparada en 160 animales en la zona pre-escapular y la lectura de la misma se interpretó a dos tiempos (72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs). En la explotación 1, la IDTB simple y comparada se realizó además en las localizaciones axilar y cervical y se incrementó al doble la dosis de la PPD bovina empleada en una proporción de animales (n=106). En el presente trabajo también se realizó el DR-ELISA con muestras obtenidas en dos tiempos, antes de realizar la IDTB simple (n=160) y 120 horas tras la inoculación de las PPDs (n=157).

IDTB simple y comparada

Para la realización de la IDTB simple y comparada se emplearon las PPDs incluidas de rutina en España en ganado bovino y caprino (CZ Veterinaria, España). En cada inoculación se administró un volumen de 0,1 ml, PPD aviar (0,5 mg/ml, 2.500 IU) y PPD bovina

(1 mg/ml, 2.500 IU). La lectura de la prueba se realizó 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs. Para valorar el resultado obtenido con la IDTB simple y comparada se empleó la interpretación estándar (Anexo I).

En la explotación 1 se efectuaron simultáneamente una inoculación de la PPD aviar (lado derecho) y tres inoculaciones de la PPD bovina (lado izquierdo en la localización axilar, pre-escapular y cervical). Además, se inoculó la PPD bovina al doble de la concentración estándar (5.000 IU) en 106 animales.

En la explotación 2 se efectuaron simultáneamente dos inoculaciones (0,1 ml cada una) en la localización pre-escapular, una de PPD aviar (lado derecho) y una de PPD bovina (lado izquierdo).

Prueba serológica

Para este trabajo se empleó el DR-ELISA experimental que hasta la fecha no está disponible comercialmente y que ha sido desarrollado por INGENASA (España). El DR-ELISA está basado en la detección de Ac frente al antígeno MPB83 de *M. bovis*. Para la realización del ELISA se siguió las recomendaciones descritas por el fabricante (sexto estudio experimental).

Con el fin de valorar distintos protocolos para maximizar la especificidad del ELISA, y siguiendo las recomendaciones del fabricante, se emplearon dos diluciones de las muestras de suero analizadas (1:25 y 1:50). Además, para la interpretación de los resultados según las instrucciones del fabricante, se incluyeron dos puntos de corte, considerando un animal positivo cuando

- La DO₄₅₀ fue superior a 0,30.
- La DO₄₅₀ fue superior a 0,40.

3.5.2.1.3. Análisis estadístico

Debido a que ninguna de las dos explotaciones había tenido historial previo de tuberculosis, se asumió que estaban libres de la infección y que, por tanto, cualquier animal que reaccionara a las pruebas diagnósticas era un falso positivo.

Para valorar la especificidad de la IDTB simple y comparada y del DR-ELISA realizados en el presente trabajo, los intervalos de confianza (IC) del 95%, se obtuvieron mediante el método de Wilson analizando los datos con el programa *Win Pepi [WINPEPI software (PEPI-for-Windows) V. 11.35]*. Las diferencias en el resultado cuantitativo (incremento de grosor de la piel, mm) en las distintas localizaciones realizando la lectura de la IDTB simple y comparada a varios tiempos y empleando dos concentraciones de la PPD, se analizaron empleando el test de Wilcoxon y el test de Mann-Whitney. Además, el test de Wilcoxon se empleó también para analizar la posible diferencia entre la DO (valor cuantitativo)

obtenida con el DR-ELISA entre muestras obtenidas antes y después de la IDTB en cada misma explotación.

3.4.2.2. Resultados

Los resultados obtenidos se describen en primer lugar para cada una de las pruebas diagnósticas realizadas (IDTB simple y comparada y prueba serológica), y en segundo lugar el análisis de la respuesta de base humoral antes y después de la inoculación de las PPDs.

IDTB simple y comparada

Del total de animales analizados en las dos explotaciones, únicamente se detectó un reactor en la explotación 1 a la IDTB simple realizada en la zona cervical, realizando la lectura transcurridas 72 horas y con la dosis estándar de PPD (2.500 IU). Empleando la prueba comparada no clasificó ningún animal como positivo, independientemente de la dosis de PPD empleada, de la localización seleccionada y del momento en el que se realizó la lectura de la prueba (72 o 120 horas tras la inoculación de las PPDs).

Aplicando la IDTB simple con la dosis estándar (2.500 UI), se detectó un incremento de grosor de la piel (mm) significativo interpretando la prueba a las 72 horas (test de Wilcoxon, $p=0,02$) en comparación con la lectura realizada tras 120 horas. También se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon, $p=0,04$) al emplear la dosis de 5.000 IU en la localización axilar, siendo el incremento superior 72 horas tras la inoculación de las PPDs. Por otra parte, al emplear el doble de dosis de la PPD bovina (5.000 IU) en la explotación 1, se detectaron dos animales positivos a la IDTB simple, uno (IC 95%, 84,7-99,5) cuando esta se realizó en la zona cervical y la lectura tras 120 horas (diferente del que se detectó con la dosis estándar) y el otro animal (IC 95%, 91,0-99,7) cuando la inoculación de las PPDs se efectuó en la localización pre-escapular y se interpretó a cualquiera de los dos tiempos (resultados no mostrados). La proporción de reactores (R) detectados y especificidad (E) de la IDTB simple y comparada empleando la interpretación estándar aparecen resumidos en la Tabla 29.

En la explotación 1 se observó un efecto dosis-dependiente en el incremento de espesor cutáneo (mm) al realizar la IDTB simple empleando la dosis de 5.000 IU comparado con la dosis estándar (2.500 IU) en las localizaciones axilar y pre-escapular. Este incremento además fue significativo (test de Mann-Whitney, $p<0,05$) en la zona pre-escapular realizando la lectura a las 72 horas y en las regiones pre-escapular y cervical cuando se hizo transcurridas 120 horas). Sin embargo este incremento del grosor del pliegue de piel no afectó a los resultados cualitativos y, por tanto, a la especificidad de la IDTB simple.

Tabla 29. Reactores (R) detectados y especificidad (E) obtenida empleando la IDTB simple y comparada en las dos explotaciones, efectuada en distintas localizaciones y con la lectura realizada 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs (2.500 IU).

| | Localización | IDTB* | | | |
|--------|---------------|--------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------|
| | | R 72h ¹ | E | R 120h ² | E |
| Exp. 1 | Axilar | 0/60 | 100% (94,0-100) ³ | 0/60 | 100% (94,0-100) |
| | Pre-escapular | 0/60 | 100% (94,0-100) | 0/60 | 100% (94,0-100) |
| | Cervical | 1/23 | 95,6% (79,0-99,2) | 0/20 | 100% (83,9-100) |
| Exp. 2 | Pre-escapular | 0/40 | 100% (91,2-100) | 0/40 | 100% (91,2-100) |
| | | IDTBC* | | | |
| | Localización | R 72h | E | R 120h | E |
| Exp. 1 | Axilar | 0/59 | 100% (93,9-100) | 0/59 | 100% (93,9-100) |
| | Pre-escapular | 0/58 | 100% (93,8-100) | 0/57 | 100% (93,7-100) |
| | Cervical | 0/21 | 100% (84,5-100) | 0/17 | 100% (81,6-100) |
| Exp. 2 | Pre-escapular | 0/39 | 100% (91,0-100) | 0/38 | 100% (90,8-100) |

¹Reactores a la IDTB simple/comparada obtenidos cuando la lectura se realizó 72horas post-IDTB; ²Reactores a la IDTB simple/comparada obtenidos cuando la lectura se realizó 120 horas post-IDTB; ³IC Wilson, 95%; *IDTB: IDTB simple; IDTBC: IDTB comparada.

Prueba serológica

La máxima especificidad obtenida con el DR-ELISA en las dos explotaciones muestreadas se alcanzó con las muestras recogidas antes de inocular las PPDs con la dilución 1:50 y el punto de corte 0,40, siendo de 99,2% (IC 95%, 95,4-99,8) y 97,5% (IC 95%, 87,1-99,6) en las explotaciones 1 y 2 respectivamente. Además, en los dos rebaños analizados, se identificó un mayor número de reactores en el DR-ELISA cuando este se realizó con muestras obtenidas tras la prueba simple y comparada. La proporción de reactores detectados (R) y especificidad (E), obtenidos con el DR-ELISA en las dos explotaciones se muestran en la Tabla 30.

En la explotación 1 al usar la dilución 1:50 y el punto de corte 0,30, el número de reactores se incrementó de 3 a 6, con lo que la especificidad obtenida disminuyó de 97,5% (IC 95%, 92,9-99,1) a 94,9% (IC 95%, 89,3-97,6). Con esa misma dilución y el punto de corte de 0,40, hubo un animal positivo con las muestras recogidas antes de la IDTB simple y comparada [valor de especificidad de 99,2% (IC 95%, 95,4-99,8), detectándose cuatro reactores con muestras recogidas 120 horas tras la IDTB simple y comparada (96,6%, IC 95%, 91,6-98,7). Sin embargo, al emplear la dilución 1:25 en la explotación 1, el número de reactores fue inferior cuando las muestras se recogieron 120 horas tras la inoculación de las PPDs, incrementándose la especificidad tanto con el punto de corte 0,30 [de 95,0 % (IC 95%,

89,5-97,7) a 96,6% (IC 95%, 91,6-98,7)], como con el punto de corte de 0,40 [de 95,8% (IC 95%, 90,6-98,2) a 97,5% (IC 95%, 92,8-99,1)] (Tabla 30).

En la explotación 2 se obtuvo un mayor número de reactores cuando se analizaron muestras extraídas 120 horas tras la IDTB simple y comparada, reduciéndose, por tanto, la especificidad. Al emplear el punto de corte 0,30 con muestras obtenidas antes de realizar la IDTB simple y comparada, la especificidad con la dilución 1:25 fue de 82,5% (IC 95%, 68,1-91,2) y con la dilución 1:50 el valor fue de 92,5% (IC 95%, 80,1-97,4), disminuyendo con la dilución 1:25 a 71,8% (IC 95%, 56,2-83,5) y con la dilución 1:50 a 84,6% (IC 95%, 70,3-92,7) cuando las muestras se recogieron 120 horas tras la inoculación de las PPDs. Con el punto de corte 0,40 y muestras obtenidas antes de la prueba simple y comparada, la especificidad con la dilución 1:25 fue de 87,5% (IC 95%, 73,9-94,5) y con la dilución 1:50 de 97,5% (IC 95%, 87,1-99,6), disminuyendo con la dilución 1:25 a 82,1% (IC 95%, 67,3-91,0) y con la dilución 1:50 la especificidad fue de 87,2% (IC 95%, 73,3-94,4) con muestras recogidas 120 horas tras la inoculación de las PPDs (Tabla 30).

Tabla 30. Reactores detectados (R) y especificidad (E) obtenida con el DR-ELISA realizado con muestras obtenidas pre y 120 horas post-IDTB (simple y comparada), empleando dos diluciones (1:25 y 1:50).

| | Punto de corte | Muestras Pre-IDTB | | | |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------|
| | | R 1:25 ¹ | E | R 1:50 ² | E |
| Exp. 1 | OD ₄₅₀ >0,30 | 6/120 | 95,0% (89,5-97,7) ³ | 3/120 | 97,5% (92,9-99,1) |
| | OD ₄₅₀ >0,40 | 5/120 | 95,8% (90,6-98,2) | 1/120 | 99,2% (95,4-99,8) |
| Exp. 2 | OD ₄₅₀ >0,30 | 7/40 | 82,5% (68,1-91,2) | 3/40 | 92,5% (80,1-97,4) |
| | OD ₄₅₀ >0,40 | 5/40 | 87,5% (73,9-94,5) | 1/40 | 97,5% (87,1-99,6) |
| Muestras 120h post-IDTB | | | | | |
| | Punto de corte | R 1:25 | E | R 1:50 | E |
| Exp. 1 | OD ₄₅₀ >0,30 | 4/118 | 96,6% (91,6-98,7) | 6/118 | 94,9% (89,3-97,6) |
| | OD ₄₅₀ >0,40 | 3/118 | 97,5% (92,8-99,1) | 4/118 | 96,6% (91,6-98,7) |
| Exp. 2 | OD ₄₅₀ >0,30 | 11/39 | 71,8% (56,2-83,5) | 6/39 | 84,6% (70,3-92,7) |
| | OD ₄₅₀ >0,40 | 7/39 | 82,1% (67,3-91,0) | 5/39 | 87,2% (73,3-94,4) |

¹Reactores a la prueba serológica empleando la dilución 1:25; ²Reactores a la prueba serológica empleando la dilución 1:50; ³IC Wilson, 95%.

Incremento en el título de Ac específicos frente al MTBC antes y después de la inoculación de las PPDs

Además de analizar el efecto de la realización de la IDTB simple y comparada sobre el número de reactores obtenidos con el DR-ELISA cuando este se realizó con muestras obtenidas después de la inoculación de las PPDs, se evaluó el incremento cuantitativo en el

valor de DO con las dos diluciones evaluadas, siendo prácticamente inexistente en las dos explotaciones. En la explotación 1, cuando el ELISA se realizó con muestras obtenidas antes de la prueba simple y comparada, el valor (DO) de la mediana con la dilución 1:25 fue de 0,20 (IQR 0,15-0,29), muy similar al alcanzado con las muestras recogidas 120 horas tras la inoculación de las PPDs con la misma dilución, ya que el valor de la mediana fue 0,19 (IQR 0,15-0,27). Cuando se empleó la dilución 1:50, la mediana del valor de DO obtenido con las muestras obtenidas antes de la IDTB simple y comparada fue de 0,19 (IQR 0,17-0,27) y resultó prácticamente idéntico al que se observó cuando las muestras se recogieron tras la inoculación de las PPDs siendo entonces el valor de la mediana de 0,18 (IQR 0,16-0,27). En la Figura 25 se representan los valores obtenidos con el DR-ELISA en las dos explotaciones muestreada para el presente trabajo.

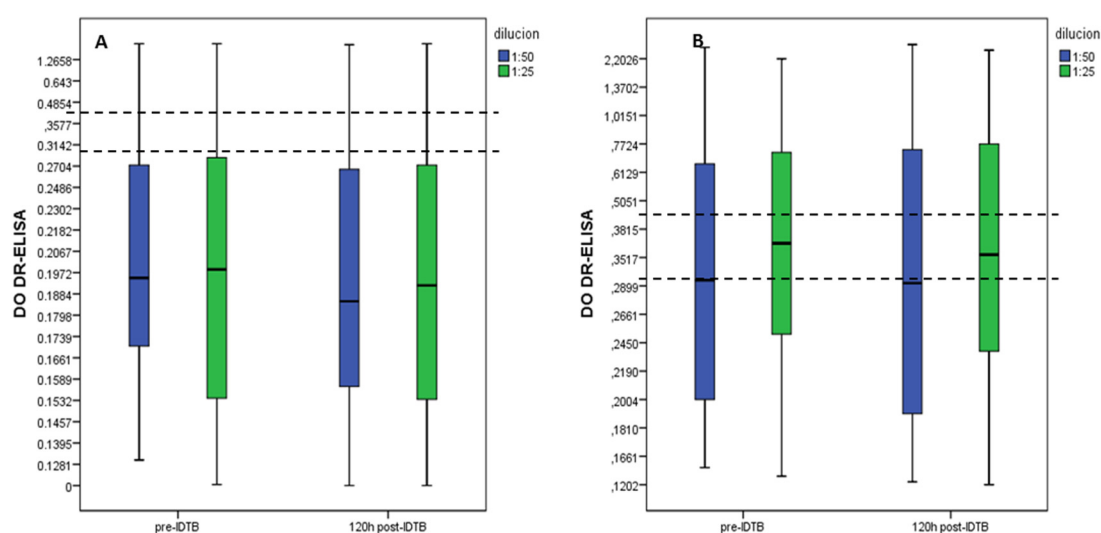


Figura 25. Valores de DO (450 nm) obtenidos con el DR-ELISA en la explotación 1 (Figura 25A, n=120) y la explotación 2 (Figura 25B, n=40). Suero obtenido pre-IDTB y 120h post-IDTB. Las líneas discontinuas representan los dos puntos de corte evaluados (0,30 y 0,40).

En la explotación 2, el valor de DO del DR-ELISA fue ligeramente superior al que se obtuvo en la explotación 1. Cuando el ELISA se realizó con las muestras obtenidas antes de la IDTB simple y comparada y con la dilución 1:25 la mediana fue 0,37 (IQR 0,25-0,71), muy similar al valor alcanzado con las muestras recogidas 120 horas tras la inoculación de las PPDs, que fue 0,36 (IQR 0,23-0,78). Cuando se empleó la dilución 1:50, de nuevo los valores obtenidos con las muestras recogidas en los dos tiempos fueron casi idénticos. La mediana del valor de DO del ELISA realizado con muestras obtenidas antes de la IDTB simple y comparada fue de 0,31 (IQR 0,20-0,64) mientras que con las muestras recogidas tras efectuar la inoculación de las PPDs la mediana fue 0,30 (IQR 0,18-0,71). No se observaron diferencias significativas (test de Wilcoxon, $p > 0,05$) en el valor de DO alcanzado por el DR-ELISA en cada explotación evaluada, con las muestras recogidas antes y después de inocular las PPDs.

Todos los animales clasificados como negativos con la prueba serológica fueron también negativos a la IDTB (simple y comparada, independientemente de la localización, del tiempo en el que se realizó la lectura de la prueba y de la dosis de la PPD empleada). Para aquellos animales que reaccionaron a la IDTB simple (independientemente de la dosis de PPD bovina empleada y de la localización seleccionada), el empleo en serie de la IDTB simple con el DR-ELISA, habría alcanzado la especificidad más elevada, ya que con la interpretación en serie es necesario que un animal sea positivo a todas las pruebas diagnósticas realizadas para considerarlo como reactor.

3.4.2.3. Resumen

Los resultados obtenidos en el séptimo estudio experimental ponen de manifiesto que en ausencia de tuberculosis confirmada, la prueba de la IDTB comparada es más específica que la prueba simple. Con la IDTB simple se identificaron tres reactores, uno con la dosis estándar de PPD bovina (2.500 IU) lectura tras 72 horas en la localización cervical, otro con la dosis de 5.000 IU, lectura tras 120 horas en la zona cervical y el tercero con la dosis de 5.000 IU, lectura a las 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs en la zona pre-escapular. Sin embargo, con la IDTB comparada no se clasificó ningún animal como positivo, independientemente de la dosis de PPD, de la localización seleccionada y del momento de realización de la lectura de la prueba. El DR-ELISA evaluado fue más específico cuando se empleó la dilución 1:50, se interpretó con el punto de corte 0,40 y al realizarse con muestras recogidas antes de inocular las PPDs. Además, en situaciones epidemiológicas en las que no exista infección el empleo en serie de la IDTB simple y el DR-ELISA demostró ser el protocolo diagnóstico más específico en llamas y alpacas, ya que con su empleo se minimizó la aparición de reactores falsos positivos, obteniendo la máxima especificidad.

4. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de diversos factores que pueden variar el resultado de las pruebas empleadas en la actualidad para el diagnóstico de tuberculosis en rumiantes (ganado bovino y caprino): IDTB y test de detección de IFN- γ . El estudio de dichos factores se realizó tanto en condiciones de campo como experimentales, para optimizar el rendimiento de las pruebas diagnósticas y favorecer la erradicación de la enfermedad. Además, en condiciones de campo también se han evaluado otras alternativas diagnósticas basadas en la modificación de las pruebas existentes, como el empleo estratégico de pruebas de base humoral. Por otra parte, se ha evaluado la interferencia diagnóstica desarrollada tras el empleo de una nueva vacuna experimental frente a la tuberculosis humana en ganado caprino, y se ha comparado la evolución de la infección producida con *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*, así como la respuesta a la IDTB y test de detección de IFN- γ , y el grado de lesión desarrollado en ganado caprino infectado de manera experimental. Estos estudios aportarán un mayor conocimiento sobre la evolución de la respuesta inmune desarrollada en el hospedador tras la infección. Por último, en camélidos de Sudamérica (en concreto llamas y alpacas), se aplicaron distintos protocolos de la IDTB y de un ELISA experimental para la detección de Ac, por una parte con el fin de determinar cuál de ellos fue el óptimo y, por otro lado valorar su rendimiento en situaciones epidemiológicas de presencia y ausencia de enfermedad, en condiciones de campo.

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA IDTB Y DEL TEST DE DETECCIÓN DE IFN- γ

Las pruebas incluidas en los programas de erradicación de tuberculosis bovina y caprina (IDTB simple o comparada y test de detección de IFN- γ) identifican principalmente animales infectados en los estadios iniciales de la infección (Pollock & Neill, 2002), permitiendo eliminarlos de la explotación limitando la transmisión de la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2014b). Resulta esencial, por tanto, maximizar el rendimiento de las mismas, para lograr este objetivo, en el capítulo I se desarrollaron tres estudios experimentales.

El primer estudio experimental tenía como objetivo específico valorar el efecto de la posición en la IDTB en ganado bovino, para lo cual se realizó un modelo Bayesiano mixto de regresión logística en animales procedentes de explotaciones calificadas OTF y animales de explotaciones infectadas de forma natural, sobre estos últimos, se evaluó además el incremento de la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas. La prueba de la IDTB se basa en la producción local de una DTH (Kindt *et al.*, 2007) tras la inoculación intradérmica de la PPD bovina (IDTB simple) y de la PPD aviar (IDTB comparada) (Monaghan *et al.*, 1994). En términos generales, se estima que la especificidad de la IDTB simple oscila entre 75 y el 99%, mientras que su sensibilidad varía

entre 63 y el 100% (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994). Sin embargo a nivel individual, el rendimiento de la prueba se ve disminuido, ya que existen multitud de variables (situación epidemiológica de la explotación, factores inherentes al animal, antígeno y protocolo empleados, etc.) que pueden interferir tanto en su realización (Humblet *et al.*, 2009), como en su interpretación (Álvarez *et al.*, 2012b), afectando a los resultados obtenidos.

Hasta la fecha, no se tenía constancia de ningún trabajo realizado con el fin de valorar el efecto de la posición en la que se inoculó la PPD bovina en la IDTB realizada en rebaños libres de tuberculosis. Sin embargo, sí se había evaluado este factor sobre animales sensibilizados con el grupo MOTT. En ese trabajo se obtuvo una mayor respuesta (mm) cuando la inoculación se realizó en la zona cervical comparado con la región caudal y la espalda (Larsen *et al.*, 1950). En este primer estudio experimental, en ausencia de tuberculosis, y conforme a los resultados obtenidos en animales sensibilizados con el grupo MOTT, se comprobó por primera vez que el resultado de la IDTB no se vio modificado por la localización donde se realizó la misma (comparando la zona cervical anterior y posterior con la pre-escapular y la escápula), independientemente de la interpretación aplicada (estándar o severa), sugiriendo que la especificidad de la IDTB tampoco se vería influenciada por este factor. La ausencia de tuberculosis se confirmó en la explotación OTF formada por animales de aptitud láctea, que se sacrificaron al finalizar el análisis, no mostrando lesiones compatibles ni crecimiento en el cultivo microbiológico.

Bajo condiciones de sensibilización experimental con miembros del MTBC, dos estudios realizados hace más de 40 años en un número reducido de animales (70 y 6 respectivamente) (Baisden *et al.*, 1951, Larsen *et al.*, 1950), presentaron resultados similares a los obtenidos en este primer estudio experimental sobre animales infectados de forma natural. En los trabajos previos se concluyó que la sensibilidad de la IDTB fue superior cuando se realizó en la parte cervical anterior, comparada con la posterior y con la zona dorsal adyacente a la columna (Baisden *et al.*, 1951, Larsen *et al.*, 1950), lo que llevó a la recomendación de que el antígeno debía inocularse en el tercio medio de la zona cervical (Paterson, 1959). Además, se usó un protocolo distinto al empleado en nuestro estudio experimental, ya que de manera paralela se inocularon la PPD bovina y la johnina (compuesto antigénico obtenido a partir de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* para el diagnóstico de la paratuberculosis) en distintas localizaciones de la región cervical y la espalda, y la lectura de la prueba se efectuó tras 48 horas tras la inoculación de los antígenos. A pesar de las diferencias en el protocolo, en ambos trabajos se demostró que la zona cervical detectó la mayor proporción de animales, a la vez que fue la que obtuvo los mayores incrementos (mm) en el espesor del pliegue cutáneo (Baisden *et al.*, 1951, Larsen *et al.*, 1950). Sin embargo, sobre animales infectados de manera natural, el efecto de la posición en el resultado de la IDTB había arrojado resultados dispares, definiéndose la zona cervical como aquella en la que se detectó una mayor proporción de reactores en un trabajo efectuado sobre animales en

los que se desconocía la prevalencia de la enfermedad (Swindle *et al.*, 1950). Mientras que en otro un trabajo más reciente, y en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio, no se observaron diferencias significativas entre la zona cervical anterior y posterior al inocular las PPDs. Esta diferencia podría ser debida a que de nuevo, el protocolo seguido para la inoculación de los antígenos fue diferente, ya que en cada lado del animal se inyectaron dos PPDs aviares y dos PPDs bovinas distintas a las empleadas en este primer estudio experimental, en la localización dorsal (craneal y caudal) y ventral (craneal y caudal) empleando una jeringa McLintock (Good *et al.*, 2011b). En este primer estudio la inoculación de la PPD bovina se realizó con el sistema de inyección mediante aire comprimido y sin aguja (Dermojet) en la zona cervical (anterior y posterior), zona pre-escapular y zona escapular, se observó una mayor probabilidad de obtener una reacción positiva en la IDTB cuando la inoculación de la PPD bovina se realizó en la zona cervical anterior, incrementando por tanto el riesgo de dejar animales potencialmente infectados en la explotación al emplear otra localización diferente de ésta. Al efectuar la IDTB en la zona cervical posterior, pre-escápula o escápula, el porcentaje de animales con respuesta positiva osciló entre 38 y 44%, comparado con el 66-70% de animales en los que hubo una respuesta positiva en la zona cervical anterior, siendo las zonas cervical posterior y la escápula las que presentaron una menor probabilidad de obtener un resultado positivo a la IDTB. En ganado bovino, la zona cervical anterior es la menos accesible desde un punto de vista práctico por lo que la inoculación de la tuberculina en esa localización requirió de más tiempo, debido a que el manejo del ganado en ocasiones es difícil (White & Benhin, 2004) y las mangas de contención no siempre son las más adecuadas ni seguras (Humblet *et al.*, 2011a, Humblet *et al.*, 2011b). Sin embargo, a pesar de invertir más tiempo en la realización de la IDTB, la aplicación de la PPD en la zona cervical anterior supondría incrementar la sensibilidad de la misma. Maximizando la detección de animales infectados se podría reducir el tiempo necesario para erradicar la enfermedad, favoreciendo su erradicación y disminuyendo de manera paralela el coste de las campañas de erradicación e incrementando la motivación de los ganaderos y de los veterinarios involucrados. Por otro lado, no se observaron diferencias entre el lado (izquierdo o derecho) en el que se realizó la IDTB, conclusión que ya se había puesto de manifiesto anteriormente (Swindle *et al.*, 1950). Al evaluar las explotaciones incluidas en este estudio independientemente, únicamente dos mostraron una mayor proporción de animales reactivos en la zona cervical anterior. Los resultados obtenidos en las demás explotaciones no se pudieron asociar con ningún otro efecto derivado del manejo, vacunaciones anteriores, aptitud de los animales, etc. Además, es necesario tener en cuenta que en cuatro de las explotaciones infectadas de manera natural, se realizó un vacío sanitario tras finalizar el análisis debido a la infección crónica de tuberculosis y, por tanto, la representatividad de los resultados obtenidos en éstas con respecto a lo que se esperaría en explotaciones con una infección más reciente, debe ser valorada cuidadosamente.

La mayor reactividad observada en la IDTB en la zona cervical anterior, podría ser debida a que en la misma existe una mayor proporción y una mayor proximidad de linfonodos regionales (mandibular, submandibular, parotídeo, retrofaríngeos y cervicales) en comparación a los que se localizan próximos a las otras regiones evaluadas. Esta podría ser la razón por la que tras la inoculación de la PPD bovina, una mayor proporción de linfocitos T acudiría al foco de inoculación (Flynn & Chan, 2001), produciendo una respuesta inmune de mayor intensidad, traduciéndose en un mayor incremento de espesor cutáneo (mm) en la localización cervical anterior. Esta teoría, podría ser extrapolable a otras especies con un modelo anatómico similar, como el ganado caprino (Creed, 1982). Además, como esta tiene un tamaño más reducido, su manejo es más fácil, permitiendo acceder más fácilmente a la localización cervical anterior. Sin embargo, en esta especie sería necesario considerar otros factores relacionados con el manejo, ya que en las razas de aptitud láctea la prueba de la IDTB se realiza en la sala de ordeño (aprovechando la inmovilización del ganado en las cornadizas), limitando el acceso a la zona cervical anterior. Por otro lado, no existe ningún estudio realizado en caprino con el fin de definir posibles diferencias en la IDTB en función de la posición en la que se inoculen las PPDs.

En relación a otros factores que pueden afectar a la IDTB, la edad ha sido ampliamente estudiada. Se ha descrito que los animales menores de seis meses tenían menor probabilidad de reaccionar a la IDTB (Griffin *et al.*, 1993b) y que a medida que la edad del animal aumentaba se incrementaba el riesgo de obtener respuestas positivas a la prueba (Ramirez-Villaescusa *et al.*, 2009), habiéndose definido que el riesgo máximo de infección está entre los 12 y 36 meses (Brooks-Pollock *et al.*, 2013). Con el fin de completar la información obtenida sobre el efecto de la posición en la IDTB, en el presente estudio se registró la edad y el sexo de los animales muestreados. Únicamente la edad influyó en el resultado de la IDTB. En los animales con edad superior a 1,92 años se observó un mayor riesgo de obtener una respuesta positiva, resultado que respalda los hallazgos descritos previamente (Brooks-Pollock *et al.*, 2013). Sin embargo, no se encontró ninguna asociación entre la respuesta obtenida en la IDTB y el sexo del animal, aunque en ganado bovino se habían descrito posibles diferencias en la IDTB entre ambos géneros (Humblet *et al.*, 2009), pudiendo ser debido a que en este primer estudio no se incluyó una proporción equitativa entre ambos sexos ya que más de la mitad de los animales analizados fueron hembras.

Históricamente, se han analizado distintas metodologías de la IDTB con el fin de incrementar la sensibilidad de la prueba. Algunas de las cuales implicaban la inoculación de la PPD bovina en más de una localización (Kerr *et al.*, 1949), otras se basaban en realizar la IDTB en el mismo animal sin respetar el periodo mínimo de 42 días, ya que generaba en los mismos una respuesta positiva inespecífica a la IDTB debido a una sensibilización frente a la PPD (Kerr *et al.*, 1946a, Palmer *et al.*, 2006). Por último, en otros trabajos se evaluó el empleo de distintas dosis de tuberculina (Francis *et al.*, 1978, Lepper *et al.*, 1977a) para valorar si el

incremento de la dosis producía una mayor sensibilidad de la IDTB, sin embargo, no se tenía constancia de ningún trabajo en el que de manera paralela se inoculara la misma dosis de PPD bovina en varias localizaciones en un mismo animal, para valorar si existía incremento de la sensibilidad de la IDTB al aumentar el número de inoculaciones de PPD bovina efectuadas. Para tal fin, se seleccionaron los animales procedentes de explotaciones infectadas de forma natural en los que se confirmó la infección. Al combinar distintos puntos en los que se inoculó la PPD bovina, se observó un incremento en la sensibilidad de la IDTB, alcanzándose la mayor con las ocho inoculaciones efectuadas (84,7%, IC 95%, 79,2-89,0), aunque el incremento en sensibilidad más relevante se observó al pasar de una a cuatro inoculaciones [de 61,7% (IC 95%, 54,9-68,0) a 79,4% (IC 95%, 73,4-84,3)]. La realización de la IDTB en varios puntos de un mismo animal es un procedimiento tedioso, sobre todo en aquellas aptitudes de manejo complicado (Keck *et al.*, 2012), incrementándose además los costes derivados del material y el tiempo empleados. Sin embargo, se podría considerar este protocolo factible desde el punto de vista práctico en determinadas situaciones epidemiológicas (por ejemplo cuando no es posible realizar el test de detección de IFN- γ), como una herramienta adicional alternativa para maximizar la detección de animales infectados.

El test de detección de IFN- γ se declaró en 2002 prueba oficial complementaria para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, con el fin de detectar el máximo número de animales infectados (Directiva Europea 64/432/CEE). El test de detección de IFN- γ es, en términos generales más sensible que la IDTB (Gormley *et al.*, 2006, Wood & Jones, 2001) y permite detectar animales en un estado de infección más reciente que aquellos identificados con la IDTB. Algunos de los factores que modifican el rendimiento del test, tales como la edad, aptitud de los animales y el número de saneamientos previos realizados ya han sido evaluados (Álvarez *et al.*, 2014a, Cagiola *et al.*, 2004, Gormley *et al.*, 2013b), aunque existen otros que requieren de estudios adicionales para valorar cómo afectan al rendimiento del test. El criterio de interpretación y el kit comercial empleados actualmente para la realización del ELISA (Wood *et al.*, 1990) difieren en función de los distintos países, por este motivo, estas dos variables han sido estudiadas en profundidad en el segundo y tercer estudio experimental de este capítulo I. El segundo estudio experimental pretendía determinar el efecto del criterio de interpretación aplicado en el test de detección de IFN- γ (empleando el kit Bovigam), en función del criterio de interpretación empleado, basado en el punto de corte numérico determinado con el valor de DO obtenido con las muestras estimuladas con PBS, PPD aviar y bovina.

La especificidad del test de detección de IFN- γ se ha estudiado bajo diversas situaciones epidemiológicas, poniendo de manifiesto que la región de procedencia del animal, la edad y la época del año en la que se realizó el muestreo son variables que de manera significativa modificaron este parámetro (Gormley *et al.*, 2013b). En este segundo estudio se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la proporción de reactores en función del

punto de corte empleado, aunque en todos los casos la especificidad del test osciló entre 89 y 100%, siendo un rango similar al estimado, que se considera en torno al 94 y 100% (Wood & Jones, 2001). El criterio (C) 3 fue el más específico de todos los evaluados (único punto de corte que no consideró la DO alcanzada con el PBS). En las dos explotaciones calificadas OTF de aptitud láctea incluidas, previamente se habían identificado animales clasificados incorrectamente como positivos en la IDTB (no se pudo confirmar la tuberculosis) y además en una de ellas también se confirmó paratuberculosis, mientras que en la otra se sospechaba (presencia de animales con signos clínicos compatibles). Por tanto, la representatividad de los resultados obtenidos en este estudio, con respecto a lo que se esperaría en explotaciones OTF en los que no exista paratuberculosis, debe ser valorada, ya que se ha descrito que la especificidad del test de detección de IFN- γ en presencia de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* se vio disminuida, dando lugar a una mayor proporción de falsos positivos (Barry *et al.*, 2011).

Al evaluar los distintos puntos de corte sobre animales procedentes de explotaciones infectadas, las diferencias obtenidas fueron más evidentes, resultado similar al descrito en un estudio realizado en Francia (Faye *et al.*, 2011). Lamentablemente, el criterio que emplea ese país no se pudo incluir en nuestro estudio porque no fue posible obtener el valor de los controles negativos y positivos de cada placa, necesarios para el cálculo del punto de corte. De los ocho criterios evaluados en el segundo estudio experimental, hubo tres (C3-C6) que obtuvieron prácticamente el mismo resultado, sugiriendo que el empleo de uno u otro no modificaría los resultados obtenidos en el test. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de armonizar varios de los criterios actualmente en uso. El mayor número de reactores se obtuvo empleando el C1 (punto de corte empleado en España) y el menor con los criterios C3-C6 observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en los resultados obtenidos. La sensibilidad obtenida con el C1 [89,1% (IC 95%, 86,9-91,0)] y el C2 [71,6% (IC 95%, 68,6-74,4)], se considera dentro del intervalo medio de sensibilidad descrito para el test, mientras que el valor arrojado con el C3-C6 [59,3% (IC 95%, 56,1-62,4)] fue inferior (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Schiller *et al.*, 2010b), debido probablemente a que el C1 incluyó el menor punto de corte numérico.

Los resultados obtenidos tanto en ausencia como en presencia de infección, remarcan la necesidad de conocer la situación epidemiológica en la que se está actuando para valorar la elección de un criterio u otro, con la finalidad de incrementar la sensibilidad o la especificidad del test según se requiera (Szmaragd *et al.*, 2012). La elección de un criterio inadecuado, supondría que animales infectados se clasifiquen como negativos, permaneciendo en la explotación y pudiendo ser fuente de infección para el resto de animales (Barlow *et al.*, 1997) y, de manera inversa, el sacrificio innecesario de un número variable de animales sanos. Además, es necesario tener en cuenta que la mayoría de los animales se sacrificaron porque habían sido reactores a las pruebas diagnósticas realizadas a nivel nacional (IDTB y test de detección de IFN- γ interpretado con el C1), no siendo la población más adecuada para evaluar

la sensibilidad, aunque permitió comparar el rendimiento del test de detección de IFN- γ aplicando diferentes criterios de interpretación. El presente trabajo se realizó siguiendo las condiciones descritas en la normativa nacional (MAGRAMA, 2015) respecto a las PPDs empleadas para la estimulación, tiempo transcurrido desde la extracción hasta la estimulación de las muestras y kit comercial seleccionado para realizar el ELISA. Por este motivo los resultados obtenidos podrían variar si el protocolo de realización del test de detección de IFN- γ empleado hubiera sido el definido en cada país en el que se usa de rutina los distintos criterios evaluados. Este hecho se pone de manifiesto, en concreto con el C1 (criterio más estricto y con el que la sensibilidad del test es mayor) actualmente en uso en un país calificado OTF (Polonia), mientras que el C3 (criterio menos estricto, con el cual el test es más específico), se aplica en un país (Reino Unido) en el que la tuberculosis bovina está presente, con una prevalencia superior al 10% (EFSA, 2015).

Al igual que se ha descrito para la IDTB, la edad también se consideró un factor determinante en el rendimiento del test de detección de IFN- γ (Álvarez *et al.*, 2014a, Gormley *et al.*, 2013b). En las explotaciones calificadas OTF se observó que la especificidad fue más limitada en animales cercanos a los seis meses de edad, siendo más relevante cuando se empleó el C1 y el C2 (criterios menos específicos), hecho que podría estar relacionado con que en animales jóvenes se ha descrito una producción no específica de IFN- γ por parte de las células NK (Olsen *et al.*, 2005), debido a que estas se encuentran en una proporción elevada en la sangre en animales jóvenes (Kulberg *et al.*, 2004). Por este motivo en España la realización de este test no se recomienda en animales menores de seis meses de edad (MAGRAMA, 2015). En presencia de tuberculosis, del total de animales infectados correctamente clasificados con el C1 (punto de corte más estricto) la probabilidad de considerarlos como negativos con el C2 fue significativamente superior únicamente en animales mayores de 10,6 años (OR=2,65, IC 95%, 1,55-4,54), mientras que con los criterios C3-C6 el riesgo ya fue significativo en animales mayores de 3 años (OR=2,25, IC 95%, 1,20-4,23). Además, es necesario tener en cuenta que en animales de edad avanzada, el sistema inmune puede verse comprometido, disminuyendo la producción de IFN- γ (Álvarez *et al.*, 2012b). A la luz los resultados obtenidos, en estos animales y en presencia de tuberculosis es recomendable emplear un criterio estricto para maximizar la detección de ejemplares infectados (Álvarez *et al.*, 2012b). Además, en los animales infectados con una edad superior a ocho años, existió una mayor probabilidad de producirse fallos diagnósticos en el test de detección de IFN- γ (Álvarez *et al.*, 2014a). Otro factor asociado con una probabilidad significativamente superior de clasificar animales infectados con el C1 pero no con los otros criterios evaluados, fue el número de saneamientos previos realizados en la explotación desde el inicio del brote. Al emplear el C2, esta probabilidad fue significativamente superior en el tercer saneamiento realizado (OR=3,22, IC 95%, 1,41-7,36), mientras que al emplear los criterios C3-C6 el riesgo ya fue significativo a partir del segundo análisis realizado (OR=1,93,

IC 95%, 1,09-3,42). El número de saneamientos realizados es especialmente relevante en aquellas explotaciones en las que los animales permanecen mucho tiempo en la misma (En España principalmente ganado de lidia y aptitud cárnica) (Humblet *et al.*, 2009). Por lo que sobre todo en situaciones de infección crónica, en las que la respuesta de base celular de los animales se ve disminuida (Pollock *et al.*, 2001) y además el número de saneamientos realizados es elevado, es esencial emplear criterios de interpretación basados en puntos de corte más estrictos, como el C1, para maximizar la sensibilidad del test. El último factor evaluado en este estudio para valorar su efecto en el rendimiento del test de detección de IFN- γ , fue la aptitud de los animales. En el segundo estudio experimental, en las explotaciones calificadas OTF, se observó una menor especificidad en el ganado de aptitud láctea en comparación con la cárnica, hallazgo descrito previamente (Coad *et al.*, 2007) y que podría ser debido a una sobreexposición de micobacterias no incluidas en el MTBC (Gormley *et al.*, 2013b), originando un mayor número de falsos positivos, disminuyendo la especificidad del test (Barry *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que en ausencia de tuberculosis y presencia de otras micobacterias, es necesario el empleo de un criterio de interpretación con un punto de corte menos estricto para que el test sea más específico. Sobre las explotaciones infectadas, la proporción de reactores obtenida fue menor al analizar muestras procedentes de Castilla y León en las que se incluyó un mayor número de animales de lidia, pudiendo ser una posible causa del menor rendimiento obtenido en el test de detección de IFN- γ (Álvarez *et al.*, 2014a, Humblet *et al.*, 2009). El ganado de lidia es especialmente susceptible al estrés producido por el manejo (Keck *et al.*, 2012), hecho que podría afectar a la producción de IFN- γ . Por ejemplo, para evitar variaciones en los resultados debidas a la aptitud del ganado, en Francia se emplea un criterio de interpretación basado en un punto de corte más estricto cuando se realiza el test de detección de IFN- γ en lidia, pasando de un 59,9% de sensibilidad con el punto de corte estándar (0,05), a 63,1% con el punto de corte alternativo (0,04) (Keck *et al.*, 2012). Sin embargo, como en este segundo estudio experimental no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en función de la aptitud de los animales, sería necesario considerar otros factores, tales como diferencias en la progresión de la respuesta inmune generada tras la infección (Pollock & Neill, 2002) y otros relacionados con el sistema de manejo, como por ejemplo una mayor edad de los animales analizados (factor comentado anteriormente). Debido a que únicamente se dispuso de la edad de los animales analizados de Castilla y León, por lo que no se pudo determinar si esta fue superior a la de los animales evaluados de la CAM.

En el tercer estudio experimental (último trabajo del capítulo I), se evaluaron tres kits comerciales (kit Bovigam, kit B y kit C) para la realización del test de detección de IFN- γ , con el objetivo específico de analizar y comparar el efecto del kit comercial sobre el resultado del test. Por motivos relacionados con la confidencialidad de los resultados, el nombre de los kits aparece codificado (excepto el del kit Bovigam, empleado de rutina en España hasta el año

2015). Los tres kits evaluados se basan en la estimulación de la sangre entera con las PPDs, el protocolo que se siguió para la realización de cada kit comercial fue el recomendado por sus respectivos fabricantes, pero con el fin de estandarizar los resultados obtenidos, además se incluyó el criterio de interpretación empleado con el kit Bovigam. Es necesario remarcar que, debido a la ausencia de publicaciones científicas disponibles sobre la comparación de diversos kits comerciales para la detección de IFN- γ , se hace alusión a comunicaciones personales, facilitadas por distintos laboratorios.

El kit Bovigam se emplea de manera adicional a la IDTB porque permite detectar animales en estado de infección más reciente que la IDTB (Gormley *et al.*, 2006, Wood & Jones, 2001), pero se desconocía si existían diferencias en cuanto a sensibilidad entre otros kits comerciales disponibles para la detección de IFN- γ . A pesar de que las muestras analizadas se seleccionaron en función al resultado del cultivo microbiológico, y a su vez los animales se habían sacrificado por ser reactores a las pruebas diagnósticas oficiales (IDTB y test de detección de IFN- γ realizado con el kit Bovigam aplicando el C1), en este último estudio del capítulo I, la proporción de animales positivos en los que se confirmó la infección (valor T+/C+) alcanzada con la IDTB fue inferior al arrojado con todos los kits evaluados para la detección de IFN- γ , independientemente de la casa comercial. Además, el rendimiento de la IDTB en este estudio fue inferior a los valores medios descritos para la prueba (Álvarez *et al.*, 2012b, Monaghan *et al.*, 1994, Praud *et al.*, 2015), pudiendo ser debido a que como son explotaciones infectadas, se sanean cada 2-6 meses de acuerdo con la normativa nacional (MAGRAMA, 2015). Esta elevada presión diagnóstica produce con frecuencia un menor rendimiento de la IDTB, ya que a medida que se eliminan los reactores del rebaño existe una mayor proporción de animales infectados en estado pre-alérgico, limitando la eficacia de las técnicas de diagnóstico (Álvarez *et al.*, 2012b). Únicamente en el grupo 1 del segundo panel (muestras negativas al kit Bovigam), la IDTB presentó un rendimiento superior al test de detección de IFN- γ (independientemente del kit comercial evaluado). En cualquier caso, el grado de concordancia observado entre la IDTB y los distintos kits de detección de IFN- γ fue entre limitado y bajo, poniendo de manifiesto que la población de animales detectados con ambas pruebas no fue el mismo (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b), recalcando que el empleo de ambas pruebas, aplicando la interpretación en paralelo maximiza la detección de animales infectados (Álvarez *et al.*, 2012b).

De los tres kits comerciales evaluados (realizados según la recomendación del fabricante), el kit Bovigam detectó la mayor proporción de animales y alcanzó el valor T+/C+ más elevado. El kit B, identificó un número de reactores menor y el valor T+/C+ obtenido fue significativamente inferior ($p < 0,05$) que el resto de kits. En otro estudio previo, el kit B obtuvo valores cuantitativos (DO) inferiores al analizar muestras de IFN- γ recombinante y detectó un positivo de seis muestras estimuladas con mitógeno (*pokeweed mitogen*-PWM), comparado con el kit Bovigam y el kit C que identificaron las seis muestras (Rhodes y colaboradores,

comunicación personal). Tras estos resultados, se modificó el segundo Ac anti-IFN- γ del kit y se hizo una nueva comparación, empleando muestras estimuladas con PWM, con IFN- γ recombinante y procedentes de animales reactivos a la IDTB, animales libres y animales infectados de manera experimental. En este segundo análisis, la sensibilidad del kit B fue similar a la del kit Bovigam ya que se identificaron los mismos animales, y no se observaron diferencias entre los valores de DO alcanzados (Rhodes y colaboradores, comunicación personal). El kit C (realizado empleando la dilución 1:2 del plasma), detectó una proporción de animales inferior al kit Bovigam y superior al kit B. Tanto en el kit B como en el kit C, la mayor proporción de reactivos y el mayor valor T+/C+ se obtuvo empleando criterios de interpretación alternativos al recomendado por el fabricante, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre estos. Además, en todos los casos los valores de DO alcanzados por el kit C fueron cuantitativamente superiores a los obtenidos con el kit Bovigam y el kit B. En un estudio en el que se comparó el kit Bovigam y el kit C en paralelo con muestras de IFN- γ recombinante y muestras estimuladas con PWM, la sensibilidad de ambos kits fue idéntica (clasificando correctamente las seis muestras evaluadas), y de forma similar a lo observado en este tercer estudio experimental, el valor de DO arrojado con el kit C fue significativamente superior al del kit Bovigam. Por este motivo, se decidió emplear la misma dilución (1:2) pero en menor volumen de muestra final (50 μ l en lugar de 100 μ l), y realizar una nueva comparación sobre muestras de animales infectados de forma experimental. En ese nuevo análisis, la sensibilidad de ambos kits fue similar, detectando el kit C cuatro animales adicionales respecto al kit Bovigam sobre un total de 22 analizados, permaneciendo los valores de DO del kit C superiores a los del kit Bovigam (Rhodes y colaboradores, comunicación personal). En otro análisis en el que se evaluaron en paralelo estos dos kits, el kit Bovigam detectó una mayor proporción de reactivos (57/82, 69,5%, IC 95%, 58,9-78,4) que el kit C (dilución 1:2). Sin embargo, al aplicar el kit Bovigam con un criterio de interpretación basado en un punto de corte menos estricto (0,1, en uso en diversos países y en zonas calificadas OTF), la proporción de reactivos fue superior con el kit C (53/82, 64,6%, IC 95% 53,8-74,1) comparado con el kit Bovigam (48/82, 58,5%, IC 95% 47,7-68,6). En todos los casos, la concordancia obtenida entre los dos kits fue elevada ($k>0,8$) (información facilitada por el MAGRAMA, 2015). Al comparar los resultados obtenidos con los dos criterios de interpretación evaluados en el primer (S/P igual o superior a 40%) y el tercer panel de muestras (S/P igual o superior a 35%), con el kit C, se detectó una menor proporción de animales con el S/P igual o superior a 35%, a pesar de ser un criterio de interpretación basado en punto de corte más estricto. Es reseñable que con el último panel de muestras incluido en el tercer estudio experimental, el rendimiento de todas las pruebas diagnósticas evaluadas fue inferior al observado anteriormente, hallazgo que podría ser debido a que en este panel se incluyó la mayor proporción de animales negativos sacrificados por infección crónica de tuberculosis.

Las mayores diferencias tanto en la proporción de animales identificados como en el valor T+/C+ alcanzados entre el kit Bovigam y el kit C fueron más evidentes en los grupos con muestras seleccionadas porque su valor de DO obtenido con el kit Bovigam fue muy próximo y/o inferior al punto de corte. Sin embargo, este hallazgo no se pudo comprobar en los demás documentos revisados ya la información del valor de DO obtenido no estaba disponible. Además de haber observado diferencias en los resultados obtenidos, se identificaron distintos requerimientos logísticos en función de los kits comerciales evaluados, que imposibilitarían su realización en laboratorios sin gran dotación logística. Para la realización del kit C, cuando la DO obtenida en el pocillo estimulado con la PPD aviar fue elevada se recomendó emplear la dilución 1:10, aumentando los costes derivados de repetir el análisis de las mismas muestras con dos diluciones distintas. Sin embargo, para la interpretación de este kit únicamente fue necesario analizar las muestras estimuladas con la PPD bovina (“muestra control”) y la PPD aviar (“muestra activada”), aumentando el número de muestras analizadas por cada placa, siendo una ventaja respecto a otros kits, ya que permitiría analizar simultáneamente un mayor número de muestras. Además, el criterio de interpretación del kit C tuvo en cuenta el valor de los controles negativos y positivos de cada placa, confiriéndole mayor robustez al punto de corte establecido. Otra novedad que presenta este kit es que plantea el empleo de un IFN- γ de referencia como control positivo para garantizar la validez de los resultados obtenidos al minimizar la variabilidad entre placas (Comtet & Pourquier, 2012).

4.2. INTERFERENCIA DE LA VACUNA *M. tuberculosis* SO2 EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN GANADO CAPRINO

La vacunación frente a la tuberculosis en el ser humano es una práctica que se realiza desde 1921 con la vacuna *M. bovis* BCG (Andersen & Woodworth, 2014b). Poco después de la introducción de la vacuna *M. bovis* BCG en el Programa Ampliado de Inmunización de la OMS en 1974, se alcanzaron tasas de cobertura de vacunación superiores al 80% en países en los que la tuberculosis era endémica. Actualmente, la vacuna se administra cada año a unos 100 millones de niños lactantes como parte de su programa nacional de inmunización infantil, en España se dejó vacunar de forma sistemática en 1980. Sobre individuos que se vacunaron cuando eran recién nacidos o lactantes, con periodos de observación de hasta 12,5 años, se determinó una protección promedio contra la tuberculosis del 51% (IC 95%, 34,0–70,0) (OMS, 2015). En animales, el empleo experimental de *M. bovis* BCG ha demostrado que no evita la infección, pero minimiza el desarrollo de lesiones, tanto en ganado doméstico (Hope *et al.*, 2011) como en especies silvestres (Buddle *et al.*, 2013a, Gortázar *et al.*, 2011), asociándose con una menor excreción de la micobacteria y una menor tasa de transmisión (Buddle *et al.*, 2008, Hope & Villarreal-Ramos, 2008, Vordermeier *et al.*, 2014). Sin embargo,

su principal inconveniente es la interferencia diagnóstica que origina, dificultando la diferenciación entre animales infectados o vacunados (Vordermeier *et al.*, 2001). Para evitar dicha interferencia producida por la vacuna *M. bovis* BCG en la IDTB y en el test de detección de IFN- γ (Andersen *et al.*, 2000, Garnier *et al.*, 2003, Vordermeier *et al.*, 2000), se han desarrollado alternativas a las PPDs consistentes en antígenos presentes en la cepa infecciosa pero ausentes en la cepa vacunal. Esta es la base de la estrategia DIVA, requisito obligatorio para el empleo potencial de la vacunación frente a tuberculosis del ganado bovino, contemplada como una estrategia para su control en determinados países (EFSA, 2013). La estrategia DIVA permite discriminar si la respuesta positiva a las pruebas diagnósticas de tuberculosis se debe a una infección o a una vacunación con *M. bovis* BCG (Vordermeier *et al.*, 2000, Vordermeier *et al.*, 2014), siendo los antígenos ESAT-6, CFP-10, Rv3615c y Rv3020c los más utilizados. El empleo de la estrategia DIVA ha sido ampliamente estudiado con la vacuna *M. bovis* BCG, pero no existe información disponible sobre el rendimiento de estos antígenos al usar otras vacunas atenuadas de características similares. En el ser humano el empleo de antígenos alternativos a las PPDs ha demostrado su potencial diagnóstico, empleando en la IDTB una formulación compuesta por ESAT-6 y CFP-10 (van Pinxteren *et al.*, 2000), así como en el test de detección de IFN- γ al usar de manera conjunta el ESAT-6, CFP-10 y TB7.7 (Matsumoto & Yamazaki, 2014).

En las últimas décadas se han desarrollado diversas vacunas alternativas con el fin de suplir las limitaciones presentes en *M. bovis* BCG, siendo un candidato prometedor una vacuna modificada genéticamente (*M. tuberculosis* SO2) (Martín *et al.*, 2006), a partir de la cual se ha desarrollado una vacuna que se encuentra en fase clínica en el ser humano. La vacuna experimental *M. tuberculosis* SO2 es una vacuna viva atenuada, que presenta una modificación en su genoma, la inactivación del gen *PhoP* (Cardona *et al.*, 2009, Martín *et al.*, 2006), fundamental en la virulencia de la micobacteria, ya que controla la secreción de proteínas antigénicas vinculadas a la región RD1. Debido a la inactivación que presenta la vacuna SO2, todas las proteínas en cuya regulación está implicada la región RD1 se expresan de manera reducida. Al contrario a lo que ocurre con la vacuna *M. bovis* BCG, en la que la región RD1 se ha perdido durante su proceso de atenuación (Mahairas *et al.*, 1996). Además la seguridad de *M. tuberculosis* SO2, se evaluó previamente en estudios realizados en cobayas, con el fin de garantizar la seguridad de la vacuna al emplearla en el ser humano u otras especies animales (Cardona *et al.*, 2009).

Debido a que no existe información disponible sobre el rendimiento de *M. tuberculosis* SO2 en ganado doméstico, el capítulo II de la presente tesis doctoral comprende un estudio experimental con el fin de evaluar la interferencia producida con la vacuna experimental *M. tuberculosis* SO2 en animales. El cuarto estudio de la presente tesis doctoral, tenía como objetivo valorar la especificidad de la IDTB y del test de detección de IFN- γ en ganado caprino libre de tuberculosis, vacunado con *M. bovis* BCG y con *M. tuberculosis* SO2 administrada por

dos vías distintas (IN y SC). Antes de realizar la vacunación de los animales, se comprobó la ausencia de respuestas positivas empleando el test de detección de IFN- γ . A pesar de que se ha descrito que es un test no recomendado en animales menores de seis meses de edad, debido a que puede originar reacciones no específicas (Kulberg *et al.*, 2004, Olsen *et al.*, 2005), en el presente trabajo la especificidad obtenida fue del 100%, ya que no hubo ningún animal clasificado como positivo, garantizando la ausencia de infección.

La realización de la IDTB con las PPDs en animales vacunados con *M. bovis* BCG ha puesto de manifiesto la existencia de una interferencia diagnóstica de carácter temporal. A pesar de que no se ha definido su duración, se ha descrito que puede prolongarse hasta seis meses tras la vacunación (Whelan *et al.*, 2011). En este trabajo, la IDTB (simple y comparada) se realizó 11 y 22 semanas tras la vacunación de los animales. En las dos pruebas, se observó una mayor interferencia diagnóstica al emplear las PPDs en lugar de los antígenos específicos. Este, hecho se describió previamente en ganado bovino vacunado con *M. bovis* BCG (Jones *et al.*, 2012, Vordermeier *et al.*, 2011, Whelan *et al.*, 2010a), siendo más relevante en el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2 administrada por la vía IN en la primera IDTB, mientras que en la segunda IDTB se produjo mayor interferencia diagnóstica con las PPDs en el grupo vacunado por la vía SC. La realización de la prueba IDTB simple con las PPDs, alcanzó una especificidad entre el 10% (IC 95%, 1,8-40,4) y el 33,3% (IC 95%, 9,7-70,0) en función del grupo evaluado (aplicada 11 semanas tras la vacunación). Cuando la IDTB simple con las PPDs se realizó 22 semanas tras la vacunación, la especificidad obtenida se incrementó, oscilando entre el 50% (IC 95%, 23,7-76,3) y el 90% (IC 95%, 59,6-98,2), sugiriendo que la interferencia ocasionada por la vacunación parece ser limitada en el tiempo. Al emplear la IDTB comparada también se observó una disminución de la interferencia diagnóstica cuando la prueba se realizó 22 semanas comparado con 11 semanas tras haber vacunado a los animales. Este resultado fue similar al obtenido en un estudio realizado con ganado bovino vacunado con *M. bovis* BCG, en el cual la proporción de reactores a la IDTB comparada alcanzó el 80% cuando esta se realizó seis meses tras la vacunación, disminuyendo al 8% cuando la prueba se efectuó nueve meses después de la vacunación (Whelan *et al.*, 2011). En este cuarto estudio, la interferencia diagnóstica disminuyó más rápidamente que en el otro ensayo consultado, debido probablemente a la diferencia de edad en los animales seleccionados para ambos trabajos, a la variabilidad individual de las especies caprina y bovina o a diferencias de la respuesta inmune desarrollada entre las vacunas empleadas. Al igual que se había descrito con la vacuna *M. bovis* BCG en ganado bovino (Whelan *et al.*, 2010a), el empleo de la prueba comparada (por norma general más específica que la IDTB simple) con las PPDs, originó cierta interferencia diagnóstica, observándose diferencias entre los grupos vacunales. En el grupo vacunado con *M. bovis* BCG la especificidad de la IDTB comparada realizada con las PPDs fue idéntica a la alcanzada con la IDTB simple: 33,3% (IC 95%, 9,7-70) realizada once semanas tras la vacunación, y 60%

(IC 95%, 23,1-88,2) cuando se efectuó 22 semanas tras la vacunación. Mientras que en el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2, la especificidad de la prueba IDTB comparada fue superior a la de la prueba simple en el grupo en el que se empleó la vacuna vía IN: 40% (IC 95%, 16,8-68,7) frente a 10% (IC 95%, 1,8-40,4) efectuada once semanas tras la vacunación y 100% (IC 95%, 72,2-100) contra 90% (IC95%, 59,6-98,2) cuando se realizó 22 semanas tras la vacunación. Estos hallazgos fueron similares a los observados en el grupo al que se le administró la vacuna SO2 vía SC: 60% (IC 95%, 31,3-83,2) contra 30% (IC 95%, 10,8-60,3), realizada once semanas tras la vacunación, y 80% (IC 95%, 49,0-94,3) frente a 50% (IC 95%, 23,7-76,3) cuando se efectuó 22 semanas tras la vacunación. A pesar de que se considera generalmente que la especificidad de la prueba comparada es superior a la de la IDTB simple (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006b, Monaghan *et al.*, 1994), en este estudio la IDTB simple o comparada alcanzaron la misma especificidad. De manera similar en ganado bovino, se ha descrito que en determinadas circunstancias la especificidad de la prueba simple puede ser similar a la de la IDTB comparada cuando se emplean las PPDs (Álvarez *et al.*, 2012b).

En animales vacunados con *M. bovis* BCG la realización de la IDTB con antígenos del complejo MTBC incrementó la especificidad de la prueba realizada con las PPDs (Lyashchenko *et al.*, 1998). Para la IDTB de este cuarto estudio se incluyó el STR1, un cóctel proteico compuesto por ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, y el STR2, que contenía los tres anteriores y además el antígeno Rv3020c. De forma similar a lo observado, cuando la IDTB se realizó con el STR1 o el STR2, la especificidad mínima obtenida fue del 90% (IC 95%, 59,6-98,2), independientemente del grupo vacunal y del momento de realización de la IDTB (11 ó 22 semanas tras la vacunación de los animales). El STR1 fue ligeramente menos específico que el STR2 (cuando la IDTB se realizó 11 semanas después de la vacunación), ya que cuando la prueba se realizó 22 semanas tras la misma, la especificidad fue del 100% con las dos formulaciones en todos los grupos vacunales. La diferencia entre las dos cócteles incluidos en la IDTB radica en el antígeno Rv3020c, ausente en el STR1 y presente en el STR2, que podría justificar el incremento en especificidad alcanzado con el STR2. Sin embargo, en ganado bovino infectado de manera experimental y vacunado con *M. bovis* BCG, la IDTB realizada con el STR2 alcanzó la misma especificidad que el STR1, a diferencia de la sensibilidad, que si se vio incrementada al añadir el Rv3020c (Jones *et al.*, 2012).

La administración de *M. bovis* BCG por distintas vías puede originar diferencias en la respuesta inmune desarrollada en el hospedador tras la vacunación, así como en la interferencia diagnóstica observada. Sable y colaboradores administraron la misma dosis de *M. bovis* BCG empleando la vía IN y la vía SC en ratones. En su estudio, observaron que la respuesta celular fue superior en los individuos en los que se empleó la vía SC (Sable *et al.*, 2011). En un trabajo posterior, también desarrollado en ratones, se comparó la administración intratraqueal y la vía SC con distintas dosis de *M. bovis* BCG, comprobando que en este caso la respuesta celular fue superior en aquellos animales en los que la vacuna se administró

intratraquealmente (Aguiló *et al.*, 2014). En este cuarto estudio, cuando la IDTB se efectuó con las PPDs once semanas tras la vacunación, el grupo que presentó mayor respuesta inmune fue el vacunado con la vacuna SO2 vía IN, mientras que cuando la prueba se realizó 22 semanas tras la vacunación de los animales, el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2 vía SC fue el que obtuvo la mayor proporción de reactores a la IDTB simple. Este hallazgo sugeriría que la vía SC causó una interferencia de mayor duración, debido probablemente a que originó una respuesta celular Th1 más fuerte que la desencadenada con la vía IN, de forma similar a lo observado en el estudio de Sable y colaboradores. Sin embargo, es necesario destacar que la vía IN no está completamente estandarizada en ganado caprino, por lo que no se podría descartar la hipótesis de que a pesar de administrar el mismo volumen en las dos vías, la dosis efectiva final fuera inferior a la inoculada empleando la vía SC. A pesar de que la administración de la vacuna por la vía IN se realizó con sumo cuidado, inmovilizando la cabeza del animal durante unos segundos tras la aplicación de la dosis para evitar que excretara el contenido, es posible que parte del volumen se ingiriera o se expulsase posteriormente de las fosas nasales mediante el estornudo, pudiendo explicar en parte la diferencia en la duración de la interferencia entre las dos vías evaluadas.

Al igual que lo observado en la IDTB, se ha descrito que el rendimiento del test de detección de IFN- γ en animales vacunados con *M. bovis* BCG fue superior al realizar el test con antígenos del complejo MTBC que empleando PPDs, obteniendo en ganado bovino vacunado y en ausencia de infección una especificidad del 100% cuando el test de detección de IFN- γ se realizó con una formulación antigénica compuesta por ESAT-6 y CFP-10 (Vordermeier *et al.*, 2001). En el cuarto estudio se emplearon dos cócteles antigénicos específicos para la estimulación de las sangres, uno compuesto por ESAT-6 y CFP-10 y otro únicamente con el antígeno Rv3615c. Cuando el test de detección de IFN- γ se realizó con las PPDs y aplicando el punto de corte que se emplea en España (0,05), en el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2 se observó interferencia diagnóstica desde la segunda semana tras la vacunación hasta el fin del estudio (24 semanas de duración). En el grupo vacunado con *M. bovis* BCG la respuesta positiva en el test de detección de IFN- γ se produjo a partir de la cuarta semana tras la vacunación, obteniendo niveles de IFN- γ inferiores a los alcanzados en el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2, sugiriendo que al igual que lo observado en la prueba IDTB, la vacuna SO2 es más inmunogénica que *M. bovis* BCG, hallazgo que podría además estar relacionado con una mayor protección alcanzada con la vacuna experimental (Arbues *et al.*, 2013). Cuando el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs se interpretó con el punto de corte más específico (0,1), la interferencia diagnóstica observada disminuyó en todos los grupos vacunales, alcanzado por tanto una especificidad más elevada. Sin embargo, el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2 vía SC continuó siendo aquel que presentó una proporción superior de reactores. Al realizar el test de detección de IFN- γ con el cóctel ESAT-6 y CFP-10 o el antígeno Rv3615c, la especificidad fue significativamente

superior ($p < 0,05$) a la alcanzada con las PPDs, independientemente del punto de corte empleado, siendo similar a los resultados obtenidos empleando estas mismas formulaciones antigénicas en trabajos previos desarrollados en ganado bovino (Bezós *et al.*, 2014b). De forma similar a lo observado en el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs, cuando el test se realizó con los dos cócteles el grupo vacunado con *M. tuberculosis* SO2 vía SC fue en el que se observó una mayor interferencia diagnóstica. En concreto, al emplear el formato ESAT-6/CFP-10 la interferencia fue ligeramente superior, ya que con el antígeno Rv3615c se detectó un animal reactor (semana 18), mientras que en los demás grupos vacunados no se identificó ningún animal positivo con este antígeno durante todo el estudio.

Este cuarto estudio experimental es el primer trabajo que evalúa la interferencia de la vacuna experimental *M. tuberculosis* SO2 en ganado doméstico, en concreto en ganado caprino. El hecho de tener que trabajar con una bacteria modificada genéticamente para atenuar su virulencia, requirió el empleo de unas instalaciones especiales de bioseguridad y obligó a reducir el número de animales en este estudio. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto, por un lado, que la especificidad de la IDTB simple y comparada y del test de detección de IFN- γ en los animales vacunados con la vacuna SO2 fue superior cuando las dos pruebas diagnósticas se realizaron con los antígenos específicos en comparación con las PPDs. Este hallazgo sugeriría que los antígenos empleados en la estrategia DIVA para diferenciar animales infectados de aquellos vacunados con la vacuna *M. bovis* BCG se podrían considerar una potencial alternativa para diferenciar también a aquellos vacunados con *M. tuberculosis* SO2. Por otro lado, las dos técnicas diagnósticas evaluadas (IDTB simple y comparada y test de detección de IFN- γ) mostraron una menor especificidad en los grupos vacunados con la vacuna experimental SO2 que en aquel en el que se administró la vacuna *M. bovis* BCG. El hecho de que la vacuna SO2 posea la región RD1 en su genoma (Cardona *et al.*, 2009, Martín *et al.*, 2006), a diferencia de *M. bovis* BCG (Mahairas *et al.*, 1996), podría explicar este hallazgo. Sin embargo, en contra de lo esperado, no se observaron diferencias significativas en relación a la interferencia diagnóstica entre las dos vacunas evaluadas. A la espera de que se confirme la eficacia de la vacuna experimental *M. tuberculosis* SO2 (en la actualidad se están desarrollando estudios para tal fin), este estudio también puso de manifiesto que la respuesta inmune desarrollada con *M. tuberculosis* SO2 fue menor cuando esta se aplicó por la vía IN que con la vía SC. Por último, a la luz de los resultados obtenidos, el ganado caprino ha demostrado que es un buen modelo experimental para desarrollar estudios aplicados en otras especies, como el ganado bovino e incluso para el ser humano (Larsen, 2015).

4.3. REACTIVIDAD FRENTE A LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS Y DESARROLLO DE LESIONES EN GANADO CAPRINO INFECTADO DE FORMA EXPERIMENTAL CON *M. bovis*, *M. caprae* Y *M. tuberculosis*

Debido a que los miembros del MTBC se consideran una población altamente clonal, con escasa o ausencia evidente de recombinación entre las distintas especies incluidas (Hershberg *et al.*, 2008, Smith *et al.*, 2006, Supply *et al.*, 2003), se podría considerar que la respuesta inmune inducida tras la infección fuera similar independientemente de la especie causal (Waters *et al.*, 2011b). Por ejemplo, en alpacas y llamas infectadas de forma natural con *M. microtti* (Lyashchenko *et al.*, 2007) o *M. bovis* (Dean *et al.*, 2009) no se han descrito diferencias en la progresión de la infección asociada a la especie del MTBC. En otro estudio realizado sobre explotaciones de ganado bovino infectadas de forma natural con *M. bovis* o con *M. caprae*, no se observaron diferencias significativas ni en la velocidad de transmisión del patógeno ni en el rendimiento de las pruebas de base celular (Álvarez *et al.*, 2012c). Sin embargo en el modelo de ratón, se ha descrito que la progresión de la infección es determinante en función de la especie del MTBC implicada (Manabe *et al.*, 2003b), siendo similar a lo observado en el jabalí (García-Jiménez *et al.*, 2013). Se podría asumir, por tanto, la existencia de diferencias en la patogenicidad y virulencia observada entre distintas especies del MTBC (Medina *et al.*, 2006), sin haberse llegado a definir si esas variaciones podrían modificar el resultado de las pruebas diagnósticas de tuberculosis o que impacto supondrían en la evolución de la infección y en la transmisión de la misma. Por este motivo, el capítulo III de la presente tesis doctoral, comprende un estudio experimental con el fin de evaluar la reactividad a las pruebas diagnósticas y las lesiones desarrolladas en ganado caprino infectado experimentalmente con distintas especies del MTBC. El quinto estudio experimental tenía como objetivo específico analizar la respuesta a la IDTB y al test de detección de IFN- γ y valorar el cuadro de lesiones desarrollado en ganado caprino infectado de forma experimental con *M. bovis* SB0134, *M. caprae* SB0157 y *M. tuberculosis* SIT58.

Para la IDTB se empleó la PPD bovina, en el caso de la prueba simple, y también la PPD aviar, en el caso de la prueba comparada (Monaghan *et al.*, 1994), realizándose la prueba simple y comparada cinco semanas tras la infección, y además de emplear las PPDs aviar y bovina, se incluyó la PPD humana. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el incremento de espesor del pliegue cutáneo de la IDTB simple, independientemente del antígeno empleado. Tampoco se observaron diferencias en los resultados cualitativos obtenidos en la IDTB empleando la PPD aviar o bovina, ya que todos los animales infectados se identificaron como positivos tanto con la IDTB simple como con la prueba comparada, realizada cinco semanas tras la infección. Sin embargo, cuando la IDTB se realizó con la PPD humana, el rendimiento de la prueba fue menor, ya que la proporción de reactivos fue inferior en todos los grupos experimentales, y curiosamente, ningún animal infectado con *M.*

tuberculosis fue positivo a la prueba. Debido a que en los grupos infectados con *M. bovis* y *M. caprae* sí se detectaron animales positivos a la IDTB realizada con la PPD humana (3/5 en animales en cada uno), la ausencia de respuestas en el grupo infectado con *M. tuberculosis* podría deberse a que el desarrollo de la respuesta inmune tras la infección con *M. tuberculosis* fue más tardía que cuando esta se produjo con *M. bovis* y *M. caprae*. De hecho, en un ensayo previo realizado sobre cultivos celulares de macrófagos, ya se habían identificado diferencias entre la actividad de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, siendo el primero más precoz en provocar la actividad macrofágica (Magee *et al.*, 2014). Sin embargo, tampoco se podría descartar factores relacionados con la propia prueba diagnóstica, como la concentración de la PPD humana empleada, ya que se administró el mismo volumen que el inoculado con las PPDs aviar y bovina (25.000 IU/ml), pero a distinta potencia biológica, siendo la de la PPD humana 2 UT/ 0,1 ml. En relación a esta tuberculina, en dos trabajos realizados en ganado bovino en Irlanda y en Reino Unido comparando PPDs humana y bovina distintas a las incluidas en este estudio, se puso de manifiesto que el rendimiento observado con la PPD humana fue inferior (Lesslie *et al.*, 1975a, Lesslie *et al.*, 1975b). En un primer trabajo, se analizaron 395 animales infectados de forma natural y 115 libres de tuberculosis, comprobándose que la PPD bovina fue más específica que la humana (Lesslie *et al.*, 1975a). En un segundo trabajo consultado, se seleccionaron 1.110 animales de 25 explotaciones sin historial de tuberculosis, en los cuales se observó un mayor número de reacciones inespecíficas empleando la PPD humana. Además, se definió que la PPD bovina era aproximadamente 1,5 veces más potente por unidad de peso que la PPD humana (Lesslie *et al.*, 1975b).

En situaciones epidemiológicas que requieran incrementar la especificidad en ausencia de tuberculosis y ante la sospecha de una posible interferencia diagnóstica, es aconsejable el empleo de la IDTB comparada (Álvarez *et al.*, 2012b). Al igual que en bovino, en ganado caprino se considera una prueba más específica que la IDTB simple (Bezós *et al.*, 2012a, Buendía *et al.*, 2013), por este motivo la prueba comparada se emplea de rutina en España para el diagnóstico de la tuberculosis en cabras. La elección de la IDTB comparada se debe principalmente a que en caprino de manera rutinaria se practica la vacunación frente a paratuberculosis (Juste & Perez, 2011) y es frecuente que estas especies presenten infección por *C. pseudotuberculosis* (Brown & Olander, 1987), pudiendo originar interferencia diagnóstica. En nuestro estudio experimental la sensibilidad de la prueba simple y comparada fue idéntica, detectando el mismo número de animales infectados. Además, el rendimiento de ambas pruebas fue superior al alcanzado en otros estudios desarrollados con ganado caprino infectado de forma natural (Bezós *et al.*, 2014b). La diferencia podría deberse al reducido número de animales empleados en la infección experimental mantenidos en condiciones controladas, así como a la cepa implicada, ya que en la mayor parte de estudios consultados la infección de forma natural se produjo por *M. bovis* (Marassi *et al.*, 2009) y/o *M. caprae* (Álvarez *et al.*, 2008).

En trabajos desarrollados empleando animales infectados de forma experimental con *M. bovis* en bovino mediante infección por vía aerógena (Waters *et al.*, 2012a), y *M. caprae* en caprino siguiendo el mismo modelo de infección al empleado en nuestro estudio (Bezós *et al.*, 2010) empleando dosis de 10^4 – 10^5 y 10^2 – 10^3 UFCs respectivamente, la respuesta positiva en el test de detección de IFN- γ se observó dos semanas tras la infección. Mientras que en un trabajo en el que se infectó ganado bovino con tres cepas de *M. bovis* (dosis de 10^5 UFCs y empleando la vía aerógena), las respuestas positivas se detectaron tres semanas después de la infección (Bass *et al.*, 2013). En nuestro estudio, los animales recibieron aproximadamente 10^4 UFCs y el grupo infectado con *M. bovis* fue el que mostró una respuesta inmune detectable más temprana, ya que dos semanas tras la infección, cuatro de los cinco animales se clasificaron como positivos en este test. Sin embargo, en los grupos infectados con *M. caprae* y *M. tuberculosis* a pesar de emplear la misma dosis infectiva, las respuestas positivas aparecieron tres semanas después de la infección. Además, la duración de la respuesta en los tres grupos experimentales se mantuvo hasta el fin del estudio, de forma similar a lo descrito en bovino y caprino (Bezós *et al.*, 2010, Waters *et al.*, 2012a). Cinco semanas tras la infección, las muestras se estimularon también con la PPD humana pero no se detectaron reactores en ninguno de los tres grupos estudiados en el test de detección de IFN- γ , pudiendo de nuevo estar relacionado con la diferencia de potencia biológica observada en las distintas PPDs. Ya que en ganado bovino también se han descrito diferencias en el test de detección de IFN- γ en función de la potencia biológica de la preparación empleada (Cagiola *et al.*, 2004, Schiller *et al.*, 2010c).

El rendimiento de las pruebas diagnósticas de base celular y/o humoral para la tuberculosis, puede diferir según el cuadro de lesiones desarrollado en el hospedador. Sobre ganado caprino infectado de forma natural con *M. caprae* SB0157, Buendía y colaboradores observaron diferencias en la sensibilidad de la IDTB y de un ELISA para la detección de Ac frente a MPB70, dependiendo del grado y número de lesiones presentes en los animales (Buendía *et al.*, 2013). La sensibilidad de la IDTB fue superior en aquellos individuos con una sola lesión (49,1%, IC 95%, 36,6-61,7), comparado con la alcanzada en animales con un mayor desarrollo de lesiones (34,2%, IC 95%, 21,2-50,1). Sin embargo, en el ELISA para la detección de Ac, la sensibilidad fue superior en los ejemplares en los que se observaron múltiples lesiones (89,4%, IC 95%, 75,9-95,8) que en aquellos en los que únicamente se detectó una sola lesión (50,8%, IC 95%, 38,3-63,4) (Buendía *et al.*, 2013). En el presente trabajo, de forma similar a lo descrito anteriormente, se observaron diferencias a las pruebas de base celular en función del desarrollo de lesiones producidas por las distintas especies del MTBC. El grupo infectado con *M. bovis* fue el que presentó un mayor desarrollo de lesiones pulmonares (4/5 animales infectados), siendo además *M. bovis* la especie más inmunogénica, tanto en la IDTB como en el test de detección de IFN- γ , y la que generó una respuesta de base celular más precoz (una semana antes respecto a los otros dos patógenos). En el grupo

infectado con *M. caprae*, se observaron lesiones compatibles en el pulmón en tres de los cinco animales infectados, mientras que los animales infectados de forma experimental con *M. tuberculosis* presentaron el menor desarrollo de lesiones. Por otra parte, en diversos trabajos se ha correlacionado la cantidad de IFN- γ detectado en el test con un mayor desarrollo de lesiones en el animal (Bezós *et al.*, 2010, Hope *et al.*, 2011), hallazgo conforme a lo observado en el grupo infectado con *M. bovis* (mayor producción de IFN- γ y desarrollo de lesiones), y con *M. tuberculosis* (menor producción de IFN- γ y desarrollo de lesiones).

En ganado caprino infectado de forma natural, es frecuente observar lesiones de tipo cavitario, que se relacionan con una mayor excreción bacteriana (Domingo *et al.*, 2014, McNair *et al.*, 2007). En este quinto estudio, al haber empleado la cabra como modelo experimental y *M. caprae*, cabría esperar que ese grupo presentara un mayor desarrollo de lesiones, tal y como se ha descrito bajo condiciones de infección natural (Sánchez *et al.*, 2011). En dicho estudio, se identificaron dos cepas de *M. caprae*, pudiendo este hallazgo explicar las diferencias respecto al cuadro de lesiones desarrollado en los dos trabajos. En el quinto estudio, los resultados del grupo infectado con *M. bovis* fueron similares a los descritos en otro trabajo en el que se infectó de forma experimental ganado caprino con *M. bovis*, a pesar de que los animales se sacrificaron 8 y 12 semanas tras la infección y que la vía de infección empleada fue la aerógena, el cuadro de lesiones desarrollado fue similar al de nuestro estudio, ya que todos los animales presentaron lesiones compatibles con la enfermedad (González-Juarrero *et al.*, 2013). Hasta la fecha no se había descrito la infección de manera experimental en ganado caprino con *M. tuberculosis*, por lo que no se pueden comparar los resultados obtenidos. *M. bovis* y en menor medida *M. caprae*, son los principales agentes responsables de la tuberculosis en las especies domésticas (Pesciaroli *et al.*, 2014), aunque también se ha descrito que la susceptibilidad a *M. tuberculosis* es relativamente alta en primates y cobayas (LoBue *et al.*, 2010). Se considera que cuando algún miembro del complejo MTBC se identifica en una especie distinta de su hospedador más frecuente, la enfermedad cursa con un menor desarrollo de lesiones, debido en parte que el crecimiento de la cepa es más lento (Ameni *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en este estudio, indican diferencias en la evolución de la infección en función de la especie del MTBC implicada, ya que de los 14 animales infectados, se confirmó la infección en 11 (presencia de lesiones compatibles y/o cultivo microbiológico positivo). El grupo de *M. bovis* fue el único en el que se confirmó la infección en todos los individuos, mientras que hubo dos animales del grupo *M. caprae*, y otro infectado con *M. tuberculosis* en los que no fue posible confirmar la presencia del patógeno, además esos tres animales tampoco presentaron lesiones compatibles con la enfermedad. Es necesario remarcar que la probabilidad de obtener un cultivo positivo de un animal infectado es mayor si se parte de muestras con lesiones compatibles (Courcoul *et al.*, 2014, Gormley *et al.*, 2014), pudiendo ser este el motivo de que no se obtuviera crecimiento positivo en el cultivo. Las tres cepas seleccionadas para la infección procedían de aislados identificados en animales, en

concreto, *M. bovis* y *M. caprae* de jabalí, y *M. tuberculosis* de bovino. Debido a que *M. tuberculosis* es el principal responsable de la enfermedad en el ser humano, se han realizado diversos estudios de modelos de infección experimental sobre ratones y cobayas, con el fin de comparar distintas cepas de la misma especie (Krishnan *et al.*, 2011, Repasy *et al.*, 2015). En conejos, se confirmó que la patogenicidad de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv fue inferior a la descrita por otras cepas de *M. tuberculosis* (Manabe *et al.*, 2003a), pero no se ha encontrado ninguna información relativa sobre *M. tuberculosis* SIT58 en animales. Además, a la luz de los resultados sobre el grado de lesión desarrollado en cada grupo experimental, cabría esperar que tanto la tasa de excreción como la transmisión de la micobacteria se vieran afectadas por la especie del MTBC implicada. A la luz de los resultados obtenidos y de acuerdo a lo descrito en bovino infectado de forma natural (Ameni *et al.*, 2013), la patogenicidad de *M. tuberculosis* en animales se supondría menor que la de *M. bovis* y *M. caprae*, siendo infrecuente que en estos se desarrolle la enfermedad, limitando la circulación del patógeno. Por ejemplo, en un estudio realizado con jabalíes infectados de forma natural con *M. bovis* y *M. caprae* (García-Jiménez *et al.*, 2013), los autores observaron diferencias significativas en el cuadro de lesiones desarrolladas en función de la especie, identificando además una mayor tasa de excreción en los animales infectados con *M. caprae* (García-Jiménez *et al.*, 2013), sin que otros factores del hospedador (como la edad o el estado general) jugaran un papel significativo. Sin embargo, en dicho estudio el emplear un modelo de infección natural, no se pudo determinar la dosis infectiva empleada.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA IDTB Y UN ELISA EXPERIMENTAL EN LLAMAS Y ALPACAS

En relación a la tuberculosis, la familia *Camelidae* está adquiriendo cada vez mayor relevancia, ya que en los últimos años el interés por los camélidos de Sudamérica para la producción de fibra o como animales de compañía ha ido en aumento, siendo la llama y la alpaca las principales especies domésticas (D'Alterio *et al.*, 2006). Al igual que en otras especies, para el diagnóstico de tuberculosis en estos animales se emplea la IDTB con los mismos criterios de interpretación que los aplicados en el ganado bovino, habiéndose descrito un limitado rendimiento (Álvarez *et al.*, 2012a). Sin embargo, la IDTB es la prueba oficial que se aplicada antes de realizar cualquier movimiento intra-comunitario (Directiva Europea 92/65/CEE). Debido al incremento en el número de brotes de tuberculosis identificados en estos animales en Europa y en EEUU, especialmente en zonas que presentan elevada prevalencia de tuberculosis bovina (García-Bocanegra *et al.*, 2010, Ryan *et al.*, 2008, Twomey *et al.*, 2012), también se ha desarrollado diversas alternativas basadas en la detección de la respuesta humoral (Rhodes *et al.*, 2012), con el fin de maximizar la detección de animales

infectados y minimizar las respuestas inespecíficas en los animales sanos. Por este motivo el capítulo IV de la presente tesis doctoral, comprende dos estudios experimentales con el fin de analizar el rendimiento de las pruebas diagnósticas de tuberculosis en camélidos de Sudamérica (llamas y alpacas). El sexto estudio experimental tenía como objetivo específico evaluar la sensibilidad de la IDTB realizada con distintos protocolos y de un ELISA experimental en alpacas infectadas con tuberculosis de forma natural.

Los resultados derivados de estudios previos en relación al rendimiento de la IDTB en los camélidos de Sudamérica sugerían que la sensibilidad de la misma se incrementaba cuando la interpretación se realizaba 96 horas tras la inoculación de las PPDs, siendo la localización axilar en la que se maximizó la detección de ejemplares infectados (Lyashchenko *et al.*, 2007, Ryan *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta la fecha, la aplicación de las PPDs en otras regiones como la zona cervical o la pre-escapular apenas se habían considerado o no existía información suficiente al respecto. El motivo podría ser debido a que se consideraba que la piel de esas localizaciones era más dura y podría afectar tanto a la realización como a la interpretación de la prueba y, por ende, a su resultado, o también quizá por practicidad. La zona axilar es la que se había seleccionado de rutina porque es más práctica, ya que no presenta abundancia de pelo, por lo que no es necesario rasurarla para realizar la IDTB (Bezoz *et al.*, 2013). En la mayor parte de los estudios consultados para evaluar el rendimiento de la IDTB realizada en llamas y alpacas, la sensibilidad fue elevada, oscilando entre el 80% (IC 95%, 28,4–99,5) y el 100% (IC 95%, 29,2–100 y 79,4–100), aunque se empleó un número limitado de animales (entre tres y 16) infectados de manera experimental (Álvarez *et al.*, 2012a). Únicamente, en un estudio realizado por Dean y colaboradores sobre llamas infectadas de forma natural, la sensibilidad obtenida fue inferior al rango descrito anteriormente [14,3% (IC 95%, 1,8–42,8)] (Dean *et al.*, 2009). Además, en dicho estudio no se especificó la interpretación de la IDTB aplicada (estándar o severa), y en la necropsia todos los animales se observaron múltiples lesiones. El limitado rendimiento de la IDTB observado en dicho estudio podría ser debido a una inadecuada interpretación de la prueba. Para desarrollar el sexto estudio se seleccionó una población de animales infectados con *M. bovis* de forma natural, en la que la IDTB se realizó en la localización axilar, pre-escapular y cervical, y la lectura de la prueba se efectuó 72 y 120 horas después de su realización. En contraste con los resultados descritos en la literatura científica, en nuestro estudio el rendimiento de la IDTB simple (interpretación severa o estándar), fue superior cuando se efectuó la lectura de la prueba 72 horas después de la inoculación de las PPDs. La proporción de animales positivos en los que se confirmó la infección (valor T+/C+) se redujo en la localización axilar, del 56,2% (IC 95%, 29,9–80,2) al 50% (IC 95%, 24,7–75,3) y del 53,8% (IC 95%, 37,2–69,9) al 20,5% (IC 95%, 9,3–36,5), cuando la lectura de la IDTB simple (interpretación severa) se realizó a las 72 y a las 120 horas tras la inoculación de las PPDs en el primer y segundo muestreo respectivamente. Al emplear la localización pre-escapular, el valor T+/C+ disminuyó

de 58,3% (IC 95%, 40,8-74,5) al 16,6% (IC 95%, 6,4-32,8), y del 80% (IC 95%, 44,4-97,5) al 70% (IC 95%, 34,8-93,3) cuando la lectura de la IDTB simple (interpretación severa) se realizó a las 72 y a las 120 horas en el segundo y tercer muestreo respectivamente. La sensibilidad de la IDTB obtenida en los trabajos consultados, desarrollados sobre animales infectados de manera experimental, fue superior, siendo las diferencias más evidentes con la interpretación estándar (Stevens *et al.*, 1998). El modelo de infección experimental permite definir la dosis infectiva empleada y conocer con exactitud el momento de la infección, permitiendo comparar la respuesta frente a las pruebas diagnósticas. Sin embargo, también se puede sobreestimar el rendimiento de las mismas, debido a que por norma general se emplean dosis infectivas superiores a las que participan de manera natural (Szmaragd *et al.*, 2012). Sin embargo, al trabajar en este sexto estudio con una población infectada de forma natural, no fue posible determinar el momento de infección cada individuo, con lo que cada animal podría hallarse en diferente fase de infección, hecho que podría haber afectado al rendimiento de la IDTB.

Al evaluar en alpacas el efecto de la posición sobre la IDTB, en contraste con lo observado en ganado bovino en el primer estudio experimental, el valor T+/C+ obtenido fue similar en las tres posiciones evaluadas en este trabajo (axilar, pre-escapular y cervical). La diferencia en los resultados obtenidos entre los dos estudios pudo ser debida a que el modelo anatómico de las dos especies evaluadas fue diferente (Creed, 1982), o a que el número de animales analizados en ambos estudios fue distinto, o también a que las posiciones incluidas en los dos trabajos no fueron las mismas; independientemente del motivo, no se pudo confirmar la causa de este hallazgo. Es destacable que en la mayoría de los animales positivos a la IDTB simple en los que el incremento de espesor cutáneo fue superior a tres mm, se observó también la presencia de signos clínicos (edema subcutáneo y dolor) en el punto de inoculación, siendo estos más evidentes cuando la lectura se realizó a las 72 horas que a las 120 horas después de la inoculación de las PPDs. El signo clínico, considerado independientemente de la lectura en mm del cutímetro, no ha sido completamente caracterizado en estos animales. Por tanto, sería recomendable definir que signos podrían ser indicativos de una respuesta positiva a la prueba de la IDTB, independientemente de la lectura en mm obtenida con el cutímetro, para maximizar la detección de individuos infectados (Lyashchenko *et al.*, 2007, Twomey *et al.*, 2012).

En relación a la IDTB comparada realizada sobre estas especies, existe gran variedad de resultados publicados. Sobre animales infectados de forma natural, la sensibilidad descrita osciló entre el 0% (IC 95%, 0-41, 0-52,2 y 0-84,2) y el 100% (IC 95%, 15,8-100), mientras que sobre animales infectados de forma experimental el rango varió entre 76,2% (IC 95%, 52,8-91,8) y 87,5% (IC 95%, 67,6-97,3) (Álvarez *et al.*, 2012a). En nuestro estudio, la IDTB comparada (interpretación severa) mostró resultados dispares en función del momento de lectura de la prueba. En la zona axilar el valor T+/C+ fue superior cuando la lectura se realizó 120 horas después de la inoculación de las PPDs en el primer y el tercer muestreo, mientras

que en el segundo muestreo, el valor T+/C+ fue superior cuando la lectura de la IDTB comparada se hizo 72 horas tras la prueba. En la localización pre-escapular, en los dos muestreos en los que se realizó, el valor T+/C+ fue superior cuando la lectura de la IDTB comparada se hizo 72 horas tras inocular las PPDs. Por último, en la localización cervical, el valor T+/C+ obtenido cuando la lectura de la IDTB comparada se realizó 72 horas después de la inoculación de las PPDs fue inferior al alcanzado cuando la lectura se efectuó a las 120 horas. A pesar de que en nuestro estudio la IDTB comparada mostró en determinadas ocasiones un rendimiento similar al de la IDTB simple, por norma general y al igual que se había descrito en ganado bovino (Álvarez *et al.*, 2012b) y caprino (Bezós *et al.*, 2012a), la prueba de la IDTB comparada mostró un menor rendimiento que la prueba simple en situaciones de infección.

Los camélidos de Sudamérica han demostrado ser muy susceptibles a la enfermedad cuando la infección se produce por *M. microti* y *M. bovis* (Bezós *et al.*, 2013). Es necesario destacar que hasta la fecha no se han notificado casos de infección en alpacas y llamas producida por otros miembros del MTBC, aunque se ha descrito la infección por *M. caprae* en un dromedario (Pate *et al.*, 2006) y *M. pinnipedii* en camellos (Jurczynski *et al.*, 2011, Moser *et al.*, 2008) mantenidos en jardines zoológicos, especies pertenecientes a los camélidos del Viejo Mundo. En este estudio, se realizó la necropsia detallada de 67 animales, se observaron lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis en un 95,5% de los animales (64/67), en los cuales el 24% de las lesiones tuberculosas identificadas fueron formaciones de tipo cavitario. Este hallazgo sugiere que la infección de forma natural producida por *M. bovis* cursa con una mayor extensión y rapidez en el desarrollo de las lesiones, pudiendo ocasionar la muerte del animal en pocos días. Este hecho, unido al comportamiento esquivo de estos animales, hace que los signos clínicos puedan pasar desapercibidos por parte de los cuidadores, los cuales describen la muerte de los animales de forma súbita. En la escasa bibliografía que existe al respecto en animales infectados de forma natural, se ha descrito una clínica inespecífica, basada en decaimiento y problemas respiratorios (Lyashchenko *et al.*, 2007, Twomey *et al.*, 2010b). En este sentido, existen otros factores a considerar, como la virulencia de la cepa implicada en el brote, para valorar la progresión de la infección (Garbaccio *et al.*, 2014, Waters *et al.*, 2014b).

Debido a que es frecuente detectar lesiones extensas en los animales infectados (Lyashchenko *et al.*, 2007, Twomey *et al.*, 2010b), se ha considerado que las pruebas de base humoral podrían ser una buena alternativa para el diagnóstico de la enfermedad en estos animales, ya que de forma tradicional el desarrollo de lesiones se ha relacionado con un incremento en el título de Ac específicos frente a los miembros del MTBC (Welsh *et al.*, 2005). A pesar de esta teoría, varios trabajos científicos han puesto de manifiesto que la sensibilidad obtenida con diversas pruebas de base humoral fue variable y generalmente, inferior a la esperada, alcanzando valores muy dispares debido al pequeño número de animales

infectados de forma natural analizados, situándose entre el 62,5% (IC 95%, 24,5-91,5) y el 100% (IC 95%, 29,2-100, 54,1-100 y 76,8-100) (Álvarez *et al.*, 2012a, Lyashchenko *et al.*, 2011, Rhodes *et al.*, 2012). Este hallazgo podría ser debido a que estos animales presentan como peculiaridad que sus Ac carecen de cadena ligera, por lo que la capacidad de unión antígeno-Ac puede verse comprometida (Muyldermans, 2001), modificando por tanto el rendimiento de las pruebas de base humoral. También se ha especulado con la posibilidad de que la sensibilidad de las pruebas serológicas difiera en función de las distintas especies de esta familia (Lyashchenko *et al.*, 2011). Numerosos estudios han descrito un incremento en el título de Ac específicos que produce un aumento en la sensibilidad de las pruebas de base humoral, cuando estas se realizaron con muestras obtenidas después efectuar la IDTB, denominado efecto *booster* (Hanna *et al.*, 1992, Palmer *et al.*, 2006, Waters *et al.*, 2006b, Waters *et al.*, 2015a). Asimismo, también se ha observado en alpacas infectadas de forma natural, empleando un ELISA experimental de doble reconocimiento (DR-ELISA), realizado en distintos tiempos tras la inoculación de las PPDs (Bezoz *et al.*, 2013), y en búfalos que habían sido reactores a la IDTB, al usar un ELISA que detectó Ac frente al antígeno MPB70 (Zarden *et al.*, 2013). En ganado bovino, este efecto se ha descrito tanto en condiciones de campo como experimentales, observándose el efecto *booster* con muestras obtenidas dos semanas tras la IDTB (Harboe *et al.*, 1990), aunque en otro estudio se evaluó la presencia del efecto *booster* con muestras recogidas 7 y 21 días después de la realización de la IDTB, concluyendo que el mejor rendimiento del ELISA se obtuvo con el suero obtenido siete días tras la inoculación de las PPDs (Marassi *et al.*, 2011).

El efecto *booster*, descrito en ganado bovino (Harboe *et al.*, 1990, Lightbody *et al.*, 1998), caprino (Gutiérrez *et al.*, 1998) y en llamas infectadas de forma natural (Dean *et al.*, 2009), permitió incrementar la sensibilidad de las pruebas para la detección de Ac cuando estas se realizaron tras la inoculación de las PPDs. En el presente estudio, se empleó un ELISA experimental (DR-ELISA) que se basa en la detección de Ac frente al antígeno MPB83. La novedad de este ELISA es que permite reconocer otras inmunoglobulinas como la IgM además de la IgG, detectando animales más recientemente infectados, comparado con otras pruebas de base humoral (Venteo *et al.*, 2012). En este estudio, la sensibilidad del DR-ELISA fue limitada cuando se realizó con muestras obtenidas antes de la IDTB simple y comparada, incrementándose cuando este se realizó con sueros obtenidos 15 y 30 días tras la inoculación de las PPDs [oscilando su valor T+/C+ entre 76,9% (IC 95%, 60,7–88,9) y 100% (IC 95%, 69,2–100)]. El valor de DO obtenido en el último muestreo con muestras recogidas antes de inocular las PPDs, fue significativamente superior al alcanzado en los muestreos anteriores antes de realizar la IDTB. Además, en el primer muestreo el DR-ELISA se realizó con sueros recogidos justo antes y 15 y 42 días después de la inoculación de las PPDs, siendo el valor de DO de la mediana y el valor T+/C+ del ELISA inferiores cuando este se realizó con muestras obtenidas 42 días tras la IDTB, hallazgo que podría deberse a que el número de

animales muestreados fue inferior. También se observó un incremento en el valor T+/C+ alcanzado con el DR-ELISA con muestras obtenidas antes de la IDTB en los sucesivos muestreos realizados, siendo 18,7% (IC 95%, 4–45,6), 43,6% (IC 95%, 27,8–60,4) y 80% (IC 95%, 44,4–97,5) en el primero, segundo y tercero respectivamente. Además de tener en cuenta que el estado inmune de los animales pudo evolucionar a lo largo de los muestreos, habría que considerar también que el número de pruebas IDTBs realizadas se incrementó durante el estudio, y pudo afectar al resultado de la prueba serológica. Asimismo, el número de inoculaciones de PPD bovina realizadas también aumentó, pasando de una en el primer muestreo, a dos en el segundo y tres en el tercero. A pesar de que el efecto de la inoculación de la IDTB en la producción de Ac y en la duración de respuesta humoral no se ha definido con exactitud, se ha especulado que la inoculación de la PPD bovina podría provocar que el sistema inmune desarrollase Ac frente a la PPD, produciendo un incremento en el título de Ac (efecto *booster*) que en ocasiones se traduce en un incremento en la sensibilidad de las pruebas de base humoral, descrito en bovino, caprino y en alpacas (Bezoz *et al.*, 2013, Gutiérrez *et al.*, 1998, Hanna *et al.*, 1992, Palmer *et al.*, 2006). En un estudio reciente realizado sobre ganado bovino infectado de forma experimental se puso de manifiesto un doble efecto *booster* que maximizó la sensibilidad del ELISA de IDEXX realizado con muestras de animales en los que se efectuó una IDTB en el pliegue caudal y a los 105 días se realizó una IDTB comparada en la región cervical, además de concluir que la inoculación de la PPD bovina incrementa únicamente la producción de Ac frente a MPB83 y MPB70 (Waters *et al.*, 2015a).

El empleo en paralelo de la IDTB con el test de detección de IFN- γ ha demostrado que incrementa la detección de animales infectados (Álvarez *et al.*, 2012b). Hallazgos similares también se han descrito al usar la IDTB y pruebas de detección de base humoral (Buendía *et al.*, 2013) y al emplear del test de detección de IFN- γ combinado con la serología (Rhodes *et al.*, 2012). En nuestro estudio experimental la aplicación en paralelo de la IDTB y del DR-ELISA fue el único protocolo con el que se detectó la totalidad de los animales infectados, sugiriendo que podría ser una buena herramienta diagnóstica en presencia de infección, tal y como se ha descrito en casos puntuales en otras especies domésticas. En un estudio realizado por Rhodes y colaboradores, se recomendó hasta el empleo de dos pruebas de base humoral diferentes en paralelo, para maximizar la detección de animales infectados (Rhodes *et al.*, 2012). Esta alternativa podría ser válida en estas especies, ya que el test de detección de IFN- γ ha demostrado un rendimiento muy limitado y es un test que no está estandarizado. Además, precisa de gran requerimiento logístico y económico, ya que es necesario realizar un paso previo para obtener las PBMCs y estimularlas posteriormente, siendo un proceso laborioso (Rhodes *et al.*, 2012).

Con el fin de complementar el sexto estudio sobre el rendimiento de las pruebas diagnósticas en camélidos de Sudamérica, se diseñó el séptimo estudio experimental (último trabajo incluido en la presente tesis doctoral), para evaluar la especificidad de la IDTB y del

DR-ELISA en ausencia de infección y en sus condiciones de origen. En Sudamérica la infección natural de alpacas y llamas con *M. bovis* ha sido escasamente documentada (Broughan *et al.*, 2013a), describiéndose únicamente en determinados casos en los que existía convivencia entre estos y algún individuo o ganado bovino infectado (Fowler, 1996). En nuestro estudio se analizaron dos rebaños (explotación 1 y explotación 2), la IDTB se realizó con distintos protocolos, inoculando las PPDs en la localización axilar, pre-escapular y cervical, la lectura de la prueba se efectuó en dos tiempos (72 y 120 horas después de la inoculación de las PPDs) y además, se valoró también el empleo de distintas dosis de la PPD bovina, concretamente 2.500 IU y 5.000 IU (la dosis estándar y el doble, únicamente en la explotación 1). Por otra parte, el DR-ELISA, se realizó con muestras obtenidas antes y después de la inoculación de las PPDs, con dos diluciones diferentes y aplicando dos puntos de corte.

De forma similar a lo observado en relación a la sensibilidad de la IDTB en los camélidos de Sudamérica, la principal limitación de los estudios consultados acerca de la especificidad fue el reducido número de animales analizados. En uno de ellos, este parámetro se evaluó sobre 12 alpacas, sin especificar la localización exacta en la que se inocularon las PPDs aviar y bovina, ni la interpretación aplicada para analizar los resultados obtenidos. En dicho estudio, la especificidad de la IDTB simple y comparada fue del 100% (IC 95%, 73,5-100) (Cousins & Florisson, 2005). Por otro lado, en llamas, la especificidad de la prueba se estudió sobre dos animales en los que la PPD bovina se inoculó en dos localizaciones (no especificadas), alcanzando la IDTB simple una especificidad del 100% (IC 95%, 15,8-100) (Stevens *et al.*, 1998). Además, respecto a la IDTB comparada, Cousins y Florisson estudiaron también la especificidad sobre 12 llamas, alcanzando el mismo valor que en alpacas [100% (IC 95%, 73,5-100)] (Cousins & Florisson, 2005). En nuestro estudio, con la IDTB simple, se detectó un animal positivo en la explotación 1 con la lectura realizada tras 72 horas en la localización cervical y con la interpretación estándar, oscilando la especificidad entre el 95,6% (IC 95%, 79,0-99,2) y el 100% (IC 95%, 83,9-100, y 94,0-100), mientras que en la explotación 2 la especificidad fue del 100% (IC 95%, 91,2-100). Cuando se empleó la IDTB comparada no se clasificó ningún animal como positivo en ninguna de las dos explotaciones, independientemente de la dosis de PPD empleada, del lugar de inoculación y del momento en el que se realizó la lectura de la prueba, alcanzando una especificidad del 100% (IC 95%, 81,6-100).

El incremento de la dosis de la PPD bovina en el resultado de la IDTB se ha evaluado en ganado bovino obteniendo resultados variables. En animales sensibilizados de forma experimental con miembros del MTBC, se observó una supresión de la reactividad a la IDTB cuando previamente se les había inoculado de forma simultánea dos dosis de PPD bovina (Lepper & Corner, 1976). En un trabajo en el que se inoculó la dosis de 0,2 ó 0,4 mg de PPD bovina en la base del pliegue caudal en una proporción similar de animales, no se observaron

diferencias en la sensibilidad ni en la especificidad de la prueba (Francis *et al.*, 1978). Mientras que en animales seleccionados porque habían sido reactores a la IDTB, se inoculó 0,1 ó 0,2 mg de PPD bovina (una dosis por animal), tanto la sensibilidad como la especificidad alcanzaron los valores más elevados al emplear la dosis más alta de PPD (Lepper *et al.*, 1977b). En contraste con estos resultados, en este séptimo estudio, se observó un efecto dosis-dependiente en el incremento de espesor cutáneo en la IDTB simple empleando la dosis de 5.000 IU comparado con la dosis de 2.500 IU, a pesar de que este hallazgo no afectó a la especificidad de la prueba. Cuando la PPD bovina se empleó al doble de la dosis estándar (5.000 IU) se detectó un animal positivo en la zona cervical y realizando la lectura a las 120 horas (diferente del que se detectó con la dosis estándar) y otro animal cuando la IDTB se efectuó en la localización pre-escapular y realizando la lectura de la IDTB 72 y/o 120 horas. Como se ha comentado anteriormente, en ganado bovino si se ha comprobado que el empleo de una PPD con una insuficiente potencia biológica detecta una menor proporción de individuos potencialmente infectados (Good *et al.*, 2011b). Tras haber realizado ensayos con distintas dosis de PPDs (O'Reilly, 1986), se decidió que la dosis mínima de antígeno para realizar la IDTB en condiciones óptimas que maximicen su sensibilidad fuera de 2.000 IU ($\pm 25\%$) por inoculación. Además, en condiciones en las que se considere que la reactividad de los animales pueda estar comprometida, se recomiendan hasta 5.000 IU por inoculación (OIE, 2009).

En ganado bovino la especificidad de las pruebas de base humoral (realizadas con muestras obtenidas antes de la IDTB), es un parámetro que en general se ha considerado elevado, aunque variable en función de la técnica empleada. Waters y colaboradores obtuvieron un valor medio de especificidad del 98% (IC 95%, 97,1-98,6) en un total de 1.473 sueros procedentes de distintos países (Waters *et al.*, 2011a) mientras que al emplear otro ELISA distinto sobre 93 animales no infectados y sobre 39 animales vacunados con *M. bovis* BCG, se obtuvo en ambos casos una especificidad del 100% (IC 95%, 96,0-100 y 91,0-100 respectivamente) (Whelan *et al.*, 2010b). Según la bibliografía consultada, la especificidad de las pruebas de base humoral en los camélidos se considera superior al 85%, independientemente de la técnica empleada. Sobre alpacas y llamas libres de tuberculosis, en las que se realizó en paralelo la técnica MAPIA (Chembio, USA) que detecta Ac frente un panel de 14 antígenos y el RT (Chembio, USA) que detecta Ac frente a tres antígenos (ESAT-6, CFP10 y MPB83), en los dos casos la especificidad alcanzada fue del 100% (IC 95%, 75,3-100) (Lyashchenko *et al.*, 2007). En otro estudio realizado sobre alpacas en las que no se había realizado la IDTB anteriormente, se analizaron de forma paralela cuatro pruebas de base humoral para la detección de Ac: la técnica MAPIA (Chembio, USA) empleando 14 antígenos, el *Dual Path Platform* (DPP) test (Chembio, USA) basado en los antígenos MPB83 and MPB70, al igual que el ELISA desarrollado por IDEXX y el ELISA de Enfer, que detectó Ac frente a un panel de siete antígenos (Rhodes *et al.*, 2012). La especificidad obtenida osciló

entre el 96,4% (IC 95%, 94,0-98,4) y el 97,4% (IC 95%, 95,6–99,2). En nuestro estudio, los valores de especificidad alcanzados con el DR-ELISA fueron ligeramente inferiores. La máxima especificidad se alcanzó con las muestras recogidas antes de inocular las PPDs con la dilución 1:50 y el punto de corte 0,40, siendo de 99,2% (IC 95%, 95,4-99,8) y 97,5% (IC 95%, 87,1-99,6) en las explotaciones 1 y 2 respectivamente. Además, el incremento cuantitativo en el valor de DO obtenido cuando el DR-ELISA se realizó con muestras obtenidas antes y 120 horas tras la inoculación de las PPDs, no fue significativo en las dos explotaciones. Es destacable que en la explotación 1 el número de reactores fue ligeramente superior cuando el ELISA se realizó con muestras recogidas antes de inocular las PPDs, sin que este hecho se pudiera justificar por la realización de una IDTB reciente, [efecto *booster*, previamente descrito en los camélidos de Sudamérica infectados de forma natural (Bezós *et al.*, 2013, Dean *et al.*, 2009)]. Tampoco se pudo relacionar este hallazgo con una menor o mayor edad de los ejemplares analizados, ya que se muestrearon individuos de diversas edades. En la explotación 2, el número de reactores detectados fue superior cuando las muestras se obtuvieron 120 horas después de realizar la IDTB (oscilando entre dos y cuatro animales de diferencia). Este hallazgo, debido posiblemente a la sensibilización producida por la IDTB en los animales, redujo la especificidad del DR-ELISA. Sin embargo, el empleo en serie de la IDTB simple con el DR-ELISA, habría alcanzado la máxima especificidad ya que el animal que fue positivo a la IDTB simple fue negativo a la prueba de base humoral.

En los dos estudios experimentales del cuarto capítulo se evaluó el rendimiento de la prueba de base humoral DR-ELISA realizada con muestras obtenidas antes y después de la IDTB sobre alpacas infectadas de forma natural, y llamas y alpacas libres de la enfermedad. El mejor rendimiento del DR-ELISA se alcanzó cuando esta se realizó con muestras obtenidas después de la inoculación de las PPDs, en concreto 15 días después de la IDTB comparado con el análisis efectuado con muestras recogidas 30 y 42 días después. En la bibliografía científica, existen multitud de trabajos en los cuales se han evaluado distintos tiempos, que oscilan desde los 7 y 21 días después de la inoculación de las PPDs (Marassi *et al.*, 2011), o los 15 días tras la inoculación de las PPDs, tanto en caprino (Gutiérrez *et al.*, 1998), como en bovino (Harboe *et al.*, 1990). Aunque se ha descrito que el incremento en la sensibilidad puede ser notable [Waters y colaboradores estimaron que la sensibilidad del ELISA de IDEXX se incrementó en un 30% en los animales con lesiones cuando el ELISA se realizó con muestras obtenidas 90-100 días tras la IDTB (Waters *et al.*, 2011a)], supone un coste adicional. Este coste deriva de una nueva visita a la explotación, y además requiere de un manejo extra del ganado, siendo un proceso tedioso, especialmente en las explotaciones en régimen extensivo y con ganado bovino de lidia (White & Benhin, 2004). Con el fin de reducir tanto el tiempo, como los costes generados por la visita adicional, sería recomendable aplicar la interpretación en paralelo de la IDTB y las pruebas de detección de Ac, con lo que estas últimas se efectuarían únicamente a los animales negativos a las pruebas de base celular,

recomendación que ya se contempla en trabajos previos (Lightbody *et al.*, 1998, Lightbody *et al.*, 2000). Por otra parte, la especificidad más elevada, en la presente tesis doctoral y en los estudios consultados realizados sobre ganado bovino (Waters *et al.*, 2011a, Whelan *et al.*, 2010b), se obtuvo cuando las pruebas de base humoral se realizaron con muestras recogidas antes de la IDTB. En resumen, en situaciones de infección, para lograr una elevada sensibilidad y una adecuada especificidad, sería recomendable realizar un único muestreo extra para minimizar el manejo de los animales y los costes, después de realizar la IDTB en aquellos animales negativos a las pruebas de base celular y aplicar la interpretación en paralelo de las pruebas diagnósticas. De esta manera, a pesar de que se produzca un detrimento en la especificidad, este se ve compensando por un aumento en la sensibilidad. Además, para minimizar las respuestas falsas positivas derivadas de la sensibilización de la PPD, en las pruebas de base humoral se podría ajustar el punto de corte para mantener la especificidad, al igual que se realiza en Francia con el test de detección de IFN- γ en regiones con baja prevalencia de tuberculosis (Faye *et al.*, 2011). Considerando su empleo con estas puntualizaciones, las pruebas de base humoral podrían aplicarse de forma estratégica, para maximizar la detección de animales infectados, cuando no es posible realizar el test de detección de IFN- γ , debido a motivos económicos, logísticos o inherentes a la propia especie animal muestreada

CONCLUSIONES

PRIMERA

La inoculación de la PPD bovina en la región cervical anterior incrementa la probabilidad de obtener una reacción positiva en la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) en ganado bovino infectado de forma natural en comparación con la regiones cervical posterior, pre-escapular y escapular.

SEGUNDA

La probabilidad de detectar alpacas infectadas mediante la IDTB simple no se ve afectada de manera significativa por el punto de inoculación (zonas axilar, pre-escapular o cervical) de la PPD bovina, siendo máxima cuando la prueba se lee a las 72 horas post-inoculación.

TERCERA

La probabilidad de obtener una reacción positiva en la IDTB en animales procedentes de rebaños libres de tuberculosis no se ve afectada por la localización en la que se inocule la PPD bovina.

CUARTA

La especificidad de la IDTB comparada en alpacas y llamas es independiente de la posición en la que se inoculen las PPDs y de la dosis de PPD bovina empleada.

QUINTA

La inoculación simultánea de ocho dosis de PPD bovina en ocho localizaciones diferentes (cervical anterior y posterior, pre-escapular y escapular a ambos lados de un mismo animal) incrementa la sensibilidad de la IDTB en función del número de inoculaciones realizadas.

SEXTA

El criterio empleado para la interpretación del test de detección de interferón-gamma (IFN- γ) Bovigam tiene un impacto significativo sobre la especificidad y la sensibilidad de la prueba, alcanzándose la mayor sensibilidad mediante el uso del criterio empleado en España.

SÉPTIMA

El rendimiento de las pruebas comerciales de detección de IFN- γ disponibles actualmente para el diagnóstico de la tuberculosis bovina varía significativamente dependiendo del fabricante.

OCTAVA

La sensibilidad del ELISA experimental (DR-ELISA) en alpacas es significativamente superior cuando se analizan muestras de suero recogidas 15 días después de efectuar la IDTB en relación a muestras recogidas inmediatamente antes de la inoculación de las PPDs, siendo estas sus condiciones óptimas de utilización.

NOVENA

El empleo del DR-ELISA realizado en condiciones óptimas en paralelo a la IDTB en alpacas infectadas de forma natural incrementa la sensibilidad diagnóstica en comparación a la obtenida únicamente con la prueba cutánea.

DÉCIMA

La respuesta inmune inducida por la vacuna *M. tuberculosis* SO2 medida mediante la IDTB y el test de detección de IFN- γ es superior a la inducida por la vacuna *M. bovis* BCG; además dicha respuesta es superior cuando la vacuna SO2 se aplica por la vía subcutánea comparado con la inoculación intranasal.

DECIMOPRIMERA

El uso de formulaciones antigénicas compuestas por ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c y por estos tres antígenos más el antígeno Rv3020c en la IDTB permite diferenciar animales infectados de aquellos vacunados con *M. tuberculosis* SO2. De igual modo el uso del antígeno Rv3615c en el test de detección de IFN- γ también permite diferenciar entre ambas categorías de animales.

DECIMOSEGUNDA

La infección experimental con *M. tuberculosis* en ganado caprino produce una menor reactividad en la IDTB y en el test de detección de IFN- γ y un menor desarrollo de lesiones que la infección producida por *M. bovis* o *M. caprae*.

CONCLUSIONS

FIRST

The inoculation of bovine PPD in the anterior cervical region increases the probability of having a positive response in the single intradermal tuberculin (SIT) test in naturally infected cattle compared with the posterior cervical, pre-scapular and shoulder regions.

SECOND

The probability of detecting infected alpacas using the SIT test is not significantly affected by the site of inoculation of the bovine PPD (axillary, pre-scapular or cervical regions), and is maximized when the test is read 72 hours after the inoculation of the PPD.

THIRD

The probability of obtaining a positive response in the SIT test in cattle from OTF herds is not affected by the site of inoculation of the bovine PPD.

FOURTH

The specificity of the single intradermal comparative cervical tuberculin (SICCT) test in alpacas and llamas is not affected by the site of inoculation of the PPDs or the dose of bovine PPD inoculated.

FIFTH

The simultaneous inoculation of eight doses of bovine PPD in eight different locations (anterior and posterior cervical, pre-scapular and scapular on both sides of the animal) increases the sensitivity of the SIT test depending on the number of inoculations performed.

SIXTH

The criteria used in the interpretation of the Bovigam interferon-gamma (IFN- γ) assay has a significant impact in both the specificity and the sensitivity of the test. The highest sensitivity is achieved using the criteria currently in place in Spain.

SEVENTH

The performance of the commercially available IFN- γ kits for the diagnosis of bovine tuberculosis varies significantly depending on the manufacturer.

EIGHTH

The sensitivity of the experimental DR-ELISA on alpacas is significantly higher when it is performed with serum samples collected 15 days after a SIT test in comparison with samples collected before the test.

NINTH

The combined use of the SIT test and the experimental DR-ELISA in naturally infected alpacas offers a higher sensitivity than the SIT test alone.

TENTH

The immune response measured using the SIT test and the IFN- γ assay in animals vaccinated with *M. tuberculosis* SO2 or *M. bovis* BCG is higher in the group vaccinated with *M. tuberculosis* SO2. Furthermore, the immune response is higher when the SO2 vaccine is administrated by the subcutaneous route compared with the intranasal one.

ELEVENTH

The use of two antigen formulations in the SIT test, one consisting in ESAT-6, CFP-10 and Rv3615c and another including those three plus the Rv3020c antigen allows the differentiation between infected animals and those vaccinated with *M. tuberculosis* SO2. Similarly the use of the Rv3615c antigen in the IFN- γ assay also differentiates between the two categories of animals.

TWELFTH

Goats experimentally infected with *M. tuberculosis* show a lower reactivity to the SIT test and the IFN- γ assay and develop less lesions than those infected with *M. bovis* or *M. caprae*.

SUMMARY EXTENDED VERSION

Tuberculosis is a bacterial zoonosis that represents an important health problem in humans, domestic animals and wildlife. The most frequently involved species in animal tuberculosis are *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*, although all the members included in the *M. tuberculosis* complex (MTBC) may produce tuberculosis. The disease has a major economic impact caused by the decreased production in animals, the commercial restrictions implied, and the costs of eradication campaigns in cattle. In the last years, tuberculosis is gaining relevance in other domestic species i.e. goats, mainly in those countries with a high census of this species. Additionally, tuberculosis in South American camelids is increasingly gaining importance in recent years, especially in regions where the disease is endemic in cattle or wildlife. Llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) are the main species imported into the European Union with the aim of serving as pets or pack animals or for production of natural fiber. Tuberculosis in these species is mainly caused by *M. bovis* and *M. microti* and it has been reported in several European countries, therefore there is an urgent need of standardize the diagnosis of tuberculosis over these species.

Eradication campaigns are based on "test-and-slaughter" strategies which implies the removal of animals that react positively to diagnostic tests for limiting the transmission of the pathogen. The official diagnostic tests approved in the European Union are the single intradermal tuberculin (SIT) test and the interferon-gamma (IFN- γ) assay, which detect the cell-mediated immune response to the pathogen, the first response involved for controlling the infection. Serological assays for the detection of antibodies are also available, commercially and/or experimentally, these techniques are not official because the immune response appears in an advanced stage of the disease, although they can be use as ancillary diagnostic test for detecting anergic animals. The only commercial vaccine available against tuberculosis, the *M. bovis* BCG do not prevent the infection but it is effective reducing the severity of lesions and this fact has been correlated with a lower transmission rates. Vaccination against tuberculosis is prohibited in cattle in the European Union (Chapter III, Article 13, Council Directive 78/52/EEC) due to the interference caused on the official diagnostic tests used for eradication affecting the herd qualification (Council Directive 64/432/EEC). Therefore it is necessary develop tools to differentiate between infected and vaccinated animals (DIVA). Current DIVA tests are mainly based on the IFN- γ assay although DIVA tests based on the SIT test and serology have also been developed. Antigens suitable for DIVA test are those present in the members of the MTBC but absent in *M. bovis* BCG. Among these antigens, the most commonly used are recombinant proteins or synthetic peptides for 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) and 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10) or combinations of them (E/C) with other antigens.

Despite of the efforts performed for the control and the eradication of the disease, in some areas it is not possible to decrease the prevalence due among others, to the limitations present in the official diagnostic techniques. Therefore, in order to optimize the diagnosis of tuberculosis in ruminants (cattle and goats) and South American camelids (llamas and alpacas), seven experimental studies divided into four chapters have been performed, each chapter has been designed to achieve the four objectives of this thesis.

Chapter I includes three studies developed for optimizing the performance of the tests currently in use for the diagnosis of tuberculosis in ruminants. The first experimental study was designed to evaluate the effect of the site of inoculation of the bovine PPD on the outcome of the SIT test in OTF and naturally infected cattle. In the absence of infection, the SIT test was not affected by the location of the PPD inoculation, however, in infected animals, the inoculation of bovine PPD in the cervical anterior area increased the probability to obtain a positive result to the SIT test. The proportion of animals with a positive response ranged between 38-44% when using different positions than the anterior cervical region (posterior cervical, pre-scapular and scapular areas), increasing to 66-70% when the inoculation of bovine PPD was performed in this region. Moreover, the sensitivity of the SIT test increased when bovine PPD was performed in one single location from 61.7% (95% CI, 54.9-68.0) to 84.7% (95% CI, 79.2-89.0) when a total of eight inoculations of bovine PPD were performed in eight different locations in the same animal. The second experimental study of this chapter was conducted with the aim to assess the effect of the interpretation criteria applied on the result of the IFN- γ assay performed using the Bovigam kit, on samples collected from OTF and naturally infected cattle. Significant differences in both specificity and sensitivity were recorded according to the interpretation criteria applied, the specificity ranged between 89 and 100%, while the sensitivity varied from 59.3% to 89.1%. Additionally, some other factors such as the age of the animal and the number of herd testing events performed in the herd since the beginning of the outbreak, may affect the performance of the IFN- γ assay depending on the interpretation criteria selected. The third experimental study (last work from chapter I), was performed to compare the result of three commercial kits for the detection of IFN- γ assay on samples from naturally infected cattle. Significant differences in the number of animals detected as positive were observed depending on the commercial kit selected. Interestingly, despite of the commercial kit assessed the proportion of detected animals and the sensitivity were lower when using alternative interpretation criteria than those recommended by each manufacturer.

Chapter II comprises the fourth experimental study of this thesis which was designed to evaluate the possible interference of *M. tuberculosis* SO2 vaccine in the diagnosis of tuberculosis in goats for the first time. The SIT test and the IFN- γ assay were performed with

PPDs and alternative antigenic formulations used to differentiate infected animals from those vaccinated with *M. bovis* BCG under the DIVA approach. The specificity of the tests that detect the cell-mediated immune response reached 100% with the antigen formulations, confirming that the antigens used for the DIVA approach could be valid for differentiating animals vaccinated with *M. tuberculosis* SO2. The *M. tuberculosis* SO2 vaccine was administered using different routes (subcutaneous and intranasal), the interference reported with the subcutaneous route in the SIT test and the IFN- γ assay was higher than that observed using the intranasal one.

Chapter III of this thesis aims to study the response to diagnostic tests and the lesions developed in goats experimentally infected with different species of the MTBC. With this purpose, the fifth experimental study was conducted, in order to evaluate the response to the SIT test and the IFN- γ assay and to assess the lesions developed in goats experimentally infected with *M. bovis*, *M. tuberculosis* and *M. caprae*. The course of the infection, the performance of diagnostic tests and the severity of the lesions developed were greatly dependent on the MTBC species involved. Animals infected with *M. bovis* or *M. caprae* showed higher lesions than those infected with *M. tuberculosis*, therefore the differences observed in the lesions developed among the three experimental groups would affect the transmission rate of the pathogen. Regarding the performance of the diagnostic techniques, all the animals infected with *M. bovis* or *M. caprae* were detected in the SIT test (performed five weeks after the infection). Regarding the IFN- γ assay, the group infected with *M. bovis* was positive to the test performed a week earlier than those infected with *M. caprae* and *M. tuberculosis*.

The final chapter (chapter IV) of the present thesis, includes two studies that evaluate the sensitivity and specificity of the SIT test (single and comparative) and an experimental serological assay for the diagnosis of tuberculosis in South American camelids (llamas and alpacas). The sixth experimental study aimed to assess the sensitivity of both tests in naturally *M. bovis* infected alpacas, the single SIT test showed higher sensitivity than the comparative one, regardless of the site (axillary, pre-scapular and cervical) of inoculation of the PPDs. Moreover, the sensitivity was higher when the reading was performed 72 hours after the inoculation of the PPDs than that achieved 120 hours after performing the SIT test. The sensitivity obtained with the serological experimental assay was higher when the assay was performed on samples collected 15 days after the SIT test, confirming the existence of a booster effect. The application in parallel of the results achieved using cellular and humoral diagnostic techniques obtained the maximum sensitivity, detecting all the infected animals. The seventh experimental study (last work of the present thesis), aimed to assess the specificity of the tests and was performed in Perú, on llamas and alpacas free of tuberculosis. The comparative SIT test was more specific than the single one, regardless of the dose (2.500 vs.

5.000 IU), the site of inoculation of PPD (axillary, pre-scapular and cervical), and the time of reading (72 hours vs. 120). The specificity of the experimental serological assay was higher when it was performed with samples collected before the SIT test, using the dilution 1:50 and the cut-off point of 0.40. Furthermore the serial interpretation of the results of both techniques resulted in increased specificity when compared to the one recorded for each test separately.

REFERENCIAS

- Aagaard, C., M. Govaerts, V. Meikle, J. A. Gutierrez-Pabello, J. McNair, P. Andersen, F. Suarez-Guemes, J. Pollock, C. Espitia and A. Cataldi, 2010: Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive veterinary medicine*, 96, 161-169.
- Aagaard, C., M. Govaerts, V. Meikle, A. J. Vallecillo, J. A. Gutierrez-Pabello, F. Suarez-Guemes, J. McNair, A. Cataldi, C. Espitia, P. Andersen and J. M. Pollock, 2006: Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of clinical microbiology*, 44, 4326-4335.
- Abalos, P. and P. Retamal, 2004: Tuberculosis: a re-emerging zoonosis? *Revue scientifique et technique*, 23, 583-594.
- Abdala, A., 1998: Tuberculosis bovina. *Sancor*, 56, 26-30.
- Acosta, B., F. Real, L. León, S. Deniz, O. Ferrer, I. Rosario and A. Ramírez, 2000: ELISA for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Australian veterinary journal*, 78, 423-424.
- Achkar, J. M., J. Chan and A. Casadevall, 2015: B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunological reviews*, 264, 167-181.
- Aguilar, D., E. Infante, C. Martin, E. Gormley, B. Gicquel and R. Hernandez Pando, 2007: Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (phoP) SO2 strain. *Clinical and experimental immunology*, 147, 330-338.
- Aguilar, D., M. J. Zumarraga, R. Jiménez, A. K. Gioffre, A. Bernardelli, H. Orozco, A. A. Cataldi and R. Hernández, 2009: *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clinical and experimental immunology*, 157, 139-147.
- Aguiló, N., A. M. Toledo, E. M. López-Román, E. Pérez-Herrán, E. Gormley, J. Rullas-Trincado, I. Angulo-Barturen and C. Martín, 2014: Pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers dose-dependent superior protection compared to that of subcutaneous vaccination. *Clinical and vaccine immunology* 21, 594-597.
- Aime, B., L. Lequen, A. Balageas, N. Haddad and J. Maugein, 2012: *M. bovis* and *M. caprae* infections in Aquitaine: A clinico-epidemiologic study of 15 patients. *Pathologie-biologie*, 60, 156-159.
- Alexander, K. A., P. N. Laver, A. L. Michel, M. Williams, P. D. van Helden, R. M. Warren and N. C. Gey van Pittius, 2010: Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases*, 16, 1296-1299.
- Altman, R. B., Clubb, S.L., Dorrestein, G.M., Quesenberry, K., 1997: *Avian medicine and surgery*.
- Álvarez, J., J. Bezoz, J. L. De, M. Vordermeier, S. Rodríguez, I. G. Fernandez-de-Mera, A. Mateos and L. Domínguez, 2012a: Diagnosis of tuberculosis in camelids: old problems, current solutions and future challenges. *Transboundary and emerging diseases*, 59, 1-10.
- Álvarez, J., J. Bezoz, M. L. de la Cruz, C. Casal, B. Romero, L. Dominguez, L. de Juan and A. Perez, 2014b: Bovine tuberculosis: Within-herd transmission models to support and direct the decision-making process. *Research in veterinary science*, 97 Suppl, S61-68.
- Álvarez, J., J. Bezoz, S. Marqués, C. Casal, A. Grau, B. Romero, S. Rodríguez-Campos, L. Guijarro, O. Mínguez, L. Domínguez and L. de Juan, 2012c: Comparison of tuberculosis outbreaks due to *M. bovis* and *M. caprae* in cattle herds in Castilla y León, Spain. Poster. 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. Brasov (Rumania).
- Álvarez, J., L. de Juan, J. Bezoz, B. Romero, J. L. Saez, S. Marques, C. Domínguez, O. Mínguez, B. Fernández-Mardomingo, A.

- Mateos, L. Domínguez and A. Aranaz, 2009: Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary microbiology*, 135, 389-393.
- Álvarez, J., L. de Juan, J. Bezos, B. Romero, J. L. Sáez, F. J. Reviriego Gordejo, V. Briones, M. A. Moreno, A. Mateos, L. Domínguez and A. Aranaz, 2008: Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Veterinary microbiology*, 128, 72-80.
- Álvarez, J., A. Pérez, J. Bezos, S. Marqués, A. Grau, J. L. Sáez, O. Mínguez, L. de Juan and L. Domínguez, 2012b: Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary microbiology*, 155, 38-43.
- Álvarez, J., A. Pérez, S. Marqués, J. Bezos, A. Grau, M. L. de la Cruz, B. Romero, J. L. Sáez, M. del Rosario Esquivel, C. Martínez Mdel, O. Mínguez, L. de Juan and L. Domínguez, 2014a: Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC veterinary research*, 10, 14.
- Allepuz, A., J. Casal, S. Napp, M. Saez, A. Alba, M. Vilar, M. Domingo, M. A. González, M. Durán-Ferrer, J. Vicente, J. Álvarez, M. Muñoz and J. L. Sáez, 2011: Analysis of the spatial variation of Bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006-2009). *Preventive veterinary medicine*, 100, 44-52.
- Amadori, M., K. P. Lyashchenko, M. L. Gennaro, J. M. Pollock and I. Zerbin, 2002: Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 85, 379-389.
- Amadori, M., S. Tameni, P. Scaccaglia, S. Cavirani, I. L. Archetti and R. Q. Giandomenico, 1998: Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds. *Journal of clinical microbiology*, 36, 566-568.
- Ameni, G., 2009: Epidemiology and immunopathology of bovine tuberculosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle in Ethiopia. Thesis (Ph.D.): 501198.
- Ameni, G., A. Aseffa, H. Engers, D. Young, S. Gordon, G. Hewinson and M. Vordermeier, 2007: High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 14, 1356-1361.
- Ameni, G., A. Aseffa, H. Engers, D. Young, G. Hewinson and M. Vordermeier, 2006: Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13, 1030-1036.
- Ameni, G., K. Tadesse, E. Hailu, Y. Deresse, G. Medhin, A. Aseffa, G. Hewinson, M. Vordermeier and S. Berg, 2013: Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* between farmers and cattle in central Ethiopia. *PloS one*, 8, e76891.
- Ameni, G., M. Vordermeier, A. Aseffa, D. B. Young and R. G. Hewinson, 2010: Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 17, 1533-1538.
- Andersen, P. and S. H. Kaufmann, 2014a: Novel vaccination strategies against tuberculosis. *Colds spring harbour perspectives medicine*, 4.
- Andersen, P., M. E. Munk, J. M. Pollock and T. M. Doherty, 2000: Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 356, 1099-1104.
- Andersen, P. and J. S. Woodworth, 2014b: Tuberculosis vaccines--rethinking the current paradigm. *Trends in immunology*, 35, 387-395.
- Anon, 1965: Bovine tuberculosis. *A Centenary of Animal Health 1865-1965*.
- Anon, 2009a: The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European union in 2007. *EFSA Journal*, 223, 142-154.
- Anon, 2009b: Analysis of bovine tuberculosis surveillance in accredited free states. 30, 7-3.
- Aranaz, A., D. Cousins, A. Mateos and L. Domínguez, 2003: Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International journal of*

- systematic and evolutionary microbiology*, 53, 1785-1789.
- Aranaz, A., L. De Juan, J. Bezos, J. Álvarez, B. Romero, F. Lozano, J. L. Paramio, J. López-Sánchez, A. Mateos and L. Domínguez, 2006: Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary research*, 37, 593-606.
- Aranaz, A., L. De Juan, N. Montero, C. Sánchez, M. Galka, C. Delso, J. Álvarez, B. Romero, J. Bezos, A. I. Vela, V. Briones, A. Mateos and L. Domínguez, 2004: Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 42, 2602-2608.
- Aranaz, A., E. Liébana, E. Gómez-Mampaso, J. C. Galán, D. Cousins, A. Ortega, J. Blázquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suárez and L. Domínguez, 1999: *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 3, 1263-1273.
- Aranaz, A., E. Liébana, X. Pickering, C. Novoa, A. Mateos and L. Domínguez, 1996: Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *The Veterinary record*, 138, 276-280.
- Araujo, L. S., F. C. Mello, B. Silva Nde, J. A. Leung, S. M. Machado, I. G. Sardella, M. Maciel Rde and M. H. Saad, 2014: Evaluation of gamma interferon immune response elicited by the newly constructed PstS-1(285-374):CFP10 fusion protein to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and vaccine immunology* : CVI, 21, 552-560.
- Arbues, A., J. I. Aguiló, J. Gonzalo-Asensio, D. Marinova, S. Uranga, E. Puentes, C. Fernández, A. Parra, P. J. Cardona, C. Vilaplana, V. Ausina, A. Williams, S. Clark, W. Malaga, C. Guilhot, B. Gicquel and C. Martin, 2013: Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine*, 31, 4867-4873.
- Ashford, D. A., E. Whitney, P. Raghunathan and O. Cosivi, 2001: Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Revue scientifique et technique*, 20, 325-337.
- Ayele, W. Y., S. D. Neill, J. Zinsstag, M. G. Weiss and I. Pavlik, 2004: Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 8, 924-937.
- Baisden, L. A., A. Larsen and T. H. Vardaman, 1951: Relative sensitivity of different skin areas of cattle to intradermal tests. *American journal of veterinary research*, 12, 273-275.
- Bakker, D., A. Eger, J. McNair, K. Riepema, P. T. J. Willemsen, J. Haagsma, F. G. Zijderfeld and J. M. Pollock, 2005: Comparison of commercially available PPDs: practical considerations for diagnosis and control of bovine tuberculosis. Poster. 4th International Conference on *Mycobacterium bovis*. Dublin (Irlanda).
- Baldwin, C. L. and J. C. Telfer, 2015: The bovine model for elucidating the role of gamma delta T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Molecular Immunology*, 66, 35-47.
- Balseiro, A., P. González-Quirós, O. Rodríguez, M. Francisca Copano, I. Merediz, L. de Juan, M. A. Chambers, R. J. Delahay, N. Marreros, L. J. Royo, J. Bezos, J. M. Prieto and C. Gortázar, 2013: Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *Veterinary journal*, 197, 739-745.
- Balseiro, A., O. Rodríguez, P. González-Quirós, I. Merediz, I. A. Sevilla, D. Dave, D. J. Dalley, S. Lesellier, M. A. Chambers, J. Bezos, M. Munoz, R. J. Delahay, C. Gortázar and J. M. Prieto, 2011: Infection of Eurasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex in Spain. *Veterinary journal*, 190, e21-25.
- Ballesteros, C., J. M. Garrido, J. Vicente, B. Romero, R. C. Galindo, E. Minguijón, M. Villar, M. P. Martín-Hernando, I. Sevilla, R. Juste, A. Aranaz, J. de la Fuente and C. Gortázar, 2009a: First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine*, 27, 6662-6668.

- Ballesteros, C., C. Gortázar, M. Canales, J. Vicente, A. Lasagna, J. A. Gamarra, R. Carrasco-García and L. Fuente Jde, 2009b: Evaluation of baits for oral vaccination of European wild boar piglets. *Research in veterinary science*, 86, 388-393.
- Banoo, S., D. Bell, P. Bossuyt, A. Herring, D. Mabey, F. Poole, P. G. Smith, N. Sriram, C. Wongsrichanalai, R. Linke, R. O'Brien, M. Perkins, J. Cunningham, P. Matsoso, C. M. Nathanson, P. Oliaro, R. W. Peeling, A. Ramsay and T. D. R. D. E. E. Panel, 2006: Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nature reviews. Microbiology*, 4, S20-32.
- Barandiaran, S., M. Martínez Vivot, E. V. Moras, A. A. Cataldi and M. J. Zumarraga, 2011: *Mycobacterium bovis* in Swine: Spoligotyping of Isolates from Argentina. *Veterinary medicine international*, 2011, 979647.
- Barlow, A. M., K. A. Mitchell and K. H. Visram, 1999: Bovine tuberculosis in llama (*Lama glama*) in the UK. *The veterinary record*, 145, 639-640.
- Barlow, N. D., J. M. Kean, G. Hickling, P. G. Livingstone and A. B. Robson, 1997: A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. *Preventive veterinary medicine*, 32, 57-75.
- Barnett, J. E., P. Booth, J. I. Brewer, J. Chanter, T. Cooper, T. Crawshaw, N. J. Davison, A. Greenwood, P. Riley, N. H. Smith and M. Wessels, 2013: *Mycobacterium bovis* infection in a grey seal pup (*Halichoerus grypus*). *The veterinary record*, 173, 168.
- Barry, C., D. Corbett, D. Bakker, P. Andersen, J. McNair and S. Strain, 2011: The effect of *Mycobacterium avium* complex infections on routine *Mycobacterium bovis* diagnostic tests. *Veterinary medicine international*, 2011, 145092.
- Barry, C. E., H. I. Boshoff, V. Dartois, T. Dick, S. Ehrt, J. Flynn, D. Schnappinger, R. J. Wilkinson and D. Young, 2009: The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 7, 845-855.
- Barthel, R., J. A. Piedrahita, D. N. McMurray, J. Payeur, D. Baca, F. Suárez Guemes, V. S. Perumaalla, T. A. Ficht, J. W. Templeton and L. G. Adams, 2000: Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *American journal of veterinary research*, 61, 1140-1144.
- Bass, K. E., B. J. Nonnecke, M. V. Palmer, T. C. Thacker, R. Hardegger, B. Schroeder, A. J. Raeber and W. R. Waters, 2013: Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20, 1827-1835.
- Bastida, R., J. Loureiro, V. Quse, A. Bernardelli, D. Rodríguez and E. Costa, 1999: Tuberculosis in a wild subantarctic fur seal from Argentina. *Journal of wildlife diseases*, 35, 796-798.
- Bates, D., M. Maechler and B. Bolker, 2011: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-38. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bayraktar, B., E. Bulut, A. B. Baris, B. Toksoy, N. Dalgic, C. Celikkan and D. Sevgi, 2011: Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *Journal of clinical microbiology*, 49, 3837-3841.
- Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick and W. J. Britton, 1999: Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *Journal of Immunology*, 162, 3504-3511.
- Bekara, M. E., L. Azizi, J. J. Bénet and B. Durand, 2014: Spatial-temporal variations of bovine tuberculosis Incidence in France between 1965 and 2000. *Transboundary and emerging diseases*, Epub ahead of print.
- Beltrán-Beck, B., C. Ballesteros, J. Vicente, J. de la Fuente and C. Gortázar, 2012: Progress in oral vaccination against tuberculosis in its main wildlife reservoir in Iberia, the eurasian wild boar. *Veterinary medicine international*, 2012, 978501.
- Beltrán-Beck, B., B. Romero, I. A. Sevilla, J. A. Barasona, J. M. Garrido, D. González-Barrio, I. Díez-Delgado, E. Minguijón, C. Casal, J. Vicente, C. Gortázar and A. Aranaz, 2014a: Assessment of an oral *Mycobacterium bovis* BCG vaccine and

- an inactivated *M. bovis* preparation for wild boar in terms of adverse reactions, vaccine strain survival, and uptake by nontarget species. *Clinical and vaccine immunology* : CVI, 21, 12-20.
- Bell, R. C., L. Hoffman-Goetz and R. Keir, 1986: Monocyte factors modulate in vitro T-lymphocyte mitogenesis in protein malnutrition. *Clinical and experimental immunology*, 63, 194–202.
- Bengis, R. G., N. P. Kriek, D. F. Keet, J. P. Raath, V. de Vos and H. F. Huchzermeyer, 1996: An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer--sparrman*) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 63, 15-18.
- Benn, C. S., M. G. Netea, L. K. Selin and P. Aaby, 2013: A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends in Immunology*, 34, 431-439.
- Bennett, R. M. and R. J. Cooke, 2006: Costs to farmers of a tuberculosis breakdown. *The Veterinary record*, 158, 429-432.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2005: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, and G. M. Garrity (eds.), Springer, New York.
- Bermúdez, H. R., E. T. Rentería, B. G. Medina, S. Hori-Oshima, A. De la Mora Valle and V. G. López, 2012: Evaluation of a lateral flow assay for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 33, 59-65.
- Berthet, F. X., P. B. Rasmussen, I. Rosenkrands, P. Andersen and B. Gicquel, 1998: A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*, 144 (Pt 11), 3195-3203.
- Bezoz, J., J. Álvarez, L. de Juan, B. Romero, S. Rodríguez, I. G. Fernández-de-Mera, R. G. Hewinson, M. Vordermeier, A. Mateos, L. Domínguez and A. Aranaz, 2011a: Assessment of in vivo and in vitro tuberculosis diagnostic tests in *Mycobacterium caprae* naturally infected caprine flocks. *Preventive veterinary medicine*, 100, 187-192.
- Bezoz, J., J. Álvarez, L. Juan, B. Romero, S. Rodríguez, E. Castellanos, J. L. Sáez-Llorente, A. Mateos, L. Domínguez and A. Aranaz, 2011b: Factors influencing the performance of an interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in goats. *Veterinary journal*, 190, 131-135.
- Bezoz, J., J. Álvarez, O. Mínguez, S. Marqués, O. Martín, V. Vigo, C. Pieltain, B. Romero, S. Rodríguez, C. Casal, A. Mateos, L. Domínguez and L. de Juan, 2012c: Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations. *Research in veterinary science*, 93, 636-640.
- Bezoz, J., J. Álvarez, B. Romero, A. Aranaz and L. Juan, 2012a: Tuberculosis in goats: assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Veterinary journal*, 191, 161-165.
- Bezoz, J., C. Casal, J. Álvarez, A. Díez-Guerrier, A. Rodríguez-Bertos, B. Romero, P. Rueda, L. Lopez, L. Domínguez and L. de Juan, 2013: Evaluation of the performance of cellular and serological diagnostic tests for the diagnosis of tuberculosis in an alpaca (*Vicugna pacos*) herd naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Preventive veterinary medicine*, 111, 304-313.
- Bezoz, J., C. Casal, B. Romero, E. Liandris, N. Sánchez, V. Vigo, L. Domínguez and L. de Juan, 2015: Lack of interference with diagnostic testing for tuberculosis in goats experimentally exposed to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary journal*, 205, 113-115.
- Bezoz, J., C. Casal, B. Romero, B. Schroeder, R. Hardegger, A. J. Raeber, L. López, P. Rueda and L. Domínguez, 2014b: Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 97 Suppl, S44-52.
- Bezoz, J., L. de Juan, B. Romero, J. Álvarez, F. Mazzucchelli, A. Mateos, L. Domínguez and A. Aranaz, 2010: Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Veterinary immunology and immunopathology*, 133, 269-275.
- Bezoz, J., S. Marqués, J. Álvarez, C. Casal, B. Romero, A. Grau, O. Mínguez, L. Domínguez and L. de Juan, 2014a: Evaluation of single and comparative intradermal tuberculin tests for

- tuberculosis eradication in caprine flocks in Castilla y León (Spain). *Research in veterinary science*, 96, 39-46.
- Bezoz, J., B. Romero, A. Delgado, J. Álvarez, C. Casal, A. Venteo, I. González, L. Domínguez and L. de Juan, 2014c: Evaluation of the specificity of intradermal tuberculin and serological tests for diagnosis of tuberculosis in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) herds under field conditions in Peru. *The Veterinary record*, 174, 532.
- Biberstein, E. L. and D. C. Hirsch, 1999: *Mycobacterium* species: The agents of Animal Tuberculosis. *Veterinary Microbiology. Blackwell Science Ltd*, 158-164.
- Bielby, J., C. A. Donnelly, L. C. Pope, T. Burke and R. Woodroffe, 2014: Badger responses to small-scale culling may compromise targeted control of bovine tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 9193-9198.
- Biet, F., M. L. Boschirolí, M. F. Thorel and L. A. Guilloteau, 2005: Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). *Veterinary research*, 36, 411-436.
- Bini, E. I., D. Mata Espinosa, B. Marquina Castillo, J. Barrios Payan, D. Colucci, A. F. Cruz, Z. L. Zatarain, E. Alfonseca, M. R. Pardo, O. Bottasso and R. Hernandez Pando, 2014: The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PloS one*, 9, e93831.
- Boddinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blocker and E. C. Bottger, 1990: Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of clinical microbiology*, 28, 1751-1759.
- Bohnert, D. W., L. A. Stalker, R. R. Mills, A. Nyman, S. J. Falck and R. F. Cooke, 2013: Late gestation supplementation of beef cows differing in body condition score: effects on cow and calf performance. *Journal of animal science*, 91, 5485-5491.
- Boland, F., G. E. Kelly, M. Good and S. J. More, 2010: Bovine tuberculosis and milk production in infected dairy herds in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 93, 153-161.
- Boniotti, M. B., M. Gorla, D. Loda, A. Garrone, A. Benedetto, A. Mondo, E. Tisato, M. Zanoni, S. Zoppi, A. Dondo, S. Tagliabue, S. Bonora, G. Zanardi and M. L. Pacciarini, 2009: Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of clinical microbiology*, 47, 636-644.
- Boussiotis, V. A., E. Y. Tsai, E. J. Yunis, S. Thim, J. C. Delgado, C. C. Dascher, A. Berezovskaya, D. Rousset, J. M. Reynes and A. E. Goldfeld, 2000: IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *The Journal of clinical investigation*, 105, 1317-1325.
- Bouts, T., M. Vordermeier, E. Flach and A. Routh, 2009: Positive skin and serologic test results of diagnostic assays for bovine tuberculosis and subsequent isolation of *Mycobacterium interjectum* in a pygmy hippopotamus (*Hexaprotodon liberiensis*). *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 40, 536-542.
- Bovine Tuberculosis Subgroup of the Task Force, 2013: *Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis sub-group of the Task Force on monitoring animal disease eradication*, SANCO/10067/2013.
- Brandt, L., J. Feino Cunha, A. Weinreich Olsen, B. Chilima, P. Hirsch, R. Appelberg and P. Andersen, 2002: Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infection and immunity*, 70, 672-678.
- Braun, H. and G. Lebek, 1958: Incidence of bovine tuberculosis infection in humans in Upper Bavaria and Swabia and the biology of both types of mammalian tubercle bacteria. *Medizinische Monatsschrift*, 12, 33-39.
- Brighenti, S. and J. Andersson, 2012: Local immune responses in human tuberculosis: learning from the site of infection. *The Journal of infectious diseases*, 205 Suppl 2, S316-324.
- Briones, V., L. de Juan, C. Sanchez, A. I. Vela, M. Galka, Montero, J. Goyache, A. Aranaz and L. Dominguez, 2000: Bovine tuberculosis and the endangered Iberian lynx. *Emerging infectious diseases*, 6, 189-191.

- Brodin, P., L. Majlessi, L. Marsollier, M. I. de Jonge, D. Bottai, C. Demangel, J. Hinds, O. Neyrolles, P. D. Butcher, C. Leclerc, S. T. Cole and R. Brosch, 2006: Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infection and immunity*, 74, 88-98.
- Brook, R. K., E. V. Wal, F. M. van Beest and S. M. McLachlan, 2013: Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up. *Preventive veterinary medicine*, 108, 137-147.
- Brooks-Pollock, E., A. J. Conlan, A. P. Mitchell, R. Blackwell, T. J. McKinley and J. L. Wood, 2013: Age-dependent patterns of bovine tuberculosis in cattle. *Veterinary research*, 44, 97.
- Brooks, S. P. and A. Gelman, 1998: General methods for monitoring convergence of iterative simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 7, 434-455.
- Brosch, R., S. V. Gordon, T. Garnier, K. Eiglmeier, W. Frigui, P. Valenti, S. Dos Santos, S. Duthoy, C. Lacroix, C. Garcia-Pelayo, J. K. Inwald, P. Golby, J. N. Garcia, R. G. Hewinson, M. A. Behr, M. A. Quail, C. Churcher, B. G. Barrell, J. Parkhill and S. T. Cole, 2007: Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5596-5601.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen and S. T. Cole, 2002: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3684-3689.
- Brosch, R., A. S. Pym, S. V. Gordon and S. T. Cole, 2001: The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in microbiology*, 9, 452-458.
- Broughan, J. M., T. R. Crawshaw, S. H. Downs, J. Brewer and R. S. Clifton-Hadley, 2013b: *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 2: A review of diagnostic methods. *Veterinary journal*, 198, 346-351.
- Broughan, J. M., S. H. Downs, T. R. Crawshaw, P. A. Upton, J. Brewer and R. S. Clifton-Hadley, 2013a: *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1: Review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004-2010. *Veterinary journal*, 198, 339-345.
- Brown, B. W., 2000: A review on reproduction in South American camelids. *Animal reproduction science*, 58, 169-195.
- Brown, C. C. and H. J. Olander, 1987: Caseous lymphadenitis of goats and sheep: A review. *Veterinary Bulletin*, 57, 1-12.
- Brown, D. H., W. P. Lafuse and B. S. Zwillling, 1998: Host resistance to mycobacteria is compromised by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 773-786.
- Buddle, B. M., F. E. Aldwell, M. A. Skinner, G. W. de Lisle, M. Denis, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson and D. N. Wedlock, 2005: Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine*, 23, 3581-3589.
- Buddle, B. M., G. W. de Lisle, A. Pfeffer and F. E. Aldwell, 1995: Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*, 13, 1123-1130.
- Buddle, B. M., M. Denis, F. E. Aldwell, H. Martin Vordermeier, R. Glyn Hewinson and D. Neil Wedlock, 2008: Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG by a combination of systemic and oral routes. *Tuberculosis*, 88, 595-600.
- Buddle, B. M., N. A. Parlane, D. N. Wedlock and A. Heiser, 2013a: Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 1, 136-146.
- Buddle, B. M., J. M. Pollock, M. A. Skinner and D. N. Wedlock, 2003a: Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *International journal for parasitology*, 33, 555-566.
- Buddle, B. M., T. J. Ryan, J. M. Pollock, P. Andersen and G. W. de Lisle, 2001: Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis

- following skin testing. *Veterinary microbiology*, 80, 37-46.
- Buddle, B. M., M. A. Skinner, D. N. Wedlock, D. M. Collins and G. W. de Lisle, 2002: New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87, 177-185.
- Buddle, B. M., D. N. Wedlock, N. A. Parlane, L. A. Corner, G. W. De Lisle and M. A. Skinner, 2003b: Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infection and immunity*, 71, 6411-6419.
- Buddle, B. M., T. Wilson, M. Denis, R. Greenwald, J. Esfandiari, K. P. Lyashchenko, S. Liggett and C. G. Mackintosh, 2010: Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 17, 626-630.
- Buddle, B. M., T. Wilson, D. Luo, H. Voges, R. Linscott, E. Martel, J. C. Lawrence and M. A. Neill, 2013b: Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis from milk samples from dairy cows. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 20, 1812-1816.
- Buendía, A. J., J. A. Navarro, J. Salinas, J. McNair, L. de Juan, N. Ortega, P. Camara, P. Torreblanca and J. Sánchez, 2013: Ante-mortem diagnosis of caprine tuberculosis in persistently infected herds: influence of lesion type on the sensitivity of diagnostic tests. *Research in veterinary science*, 95, 1107-1113.
- Bull, T. J., C. Vrettou, R. Linedale, C. McGuinness, S. Strain, J. McNair, S. C. Gilbert and J. C. Hope, 2014: Immunity, safety and protection of an Adenovirus 5 prime--Modified Vaccinia virus Ankara boost subunit vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in calves. *Veterinary research*, 45, 112.
- Buxton, J. B. and R. E. Glover, 1939: Tuberculin tests in cattle. A.R.C. Report Series No. 4 Privy Council Agricultural Research Council. Published by His Majesty's stationary office. London, England.
- Cadmus, S. I., H. K. Adesokan, A. O. Jenkins and D. van Soelingen, 2009: *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerging infectious diseases*, 15, 2066-2067.
- Cagiola, M., F. Feliziani, G. Severi, P. Pasquali and D. Rutili, 2004: Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11, 952-956.
- Calmette, A., C. Guérin, L. Nègre and A. Boquet, 1926: Prémunition des nouveau-nés contre la tuberculose par le vaccin BCG (1921 à 1926). *Annales de l'Institut Pasteur*, 40, 89-133.
- Camacho, L. R., P. Constant, C. Raynaud, M. A. Laneelle, J. A. Triccas, B. Gicquel, M. Daffe and C. Guilhot, 2001: Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *The Journal of biological chemistry*, 276, 19845-19854.
- Cardona, P. J., J. G. Asensio, A. Arbues, I. Otal, C. Lafoz, O. Gil, N. Caceres, V. Ausina, B. Gicquel and C. Martín, 2009: Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on phoP mutant. *Vaccine*, 27, 2499-2505.
- Carrique-Mas, J. J., G. F. Medley and L. E. Green, 2008: Risks for bovine tuberculosis in British cattle farms restocked after the foot and mouth disease epidemic of 2001. *Preventive veterinary medicine*, 84, 85-93.
- Carter, S. P., R. J. Delahay, G. C. Smith, D. W. Macdonald, P. Riordan, T. R. Etherington, E. R. Pimley, N. J. Walker and C. L. Cheeseman, 2007: Culling-induced social perturbation in Eurasian badgers *Meles meles* and the management of TB in cattle: an analysis of a critical problem in applied ecology. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274, 2769-2777.
- Cassidy, J. P. and A. R. Martineau, 2014: Innate resistance to tuberculosis in man, cattle and laboratory animal models: nipping disease in the bud? *Journal of comparative pathology*, 151, 291-308.
- Castets, M., N. Rist and H. Boisvert, 1969b: La variété africain du bacille tuberculeux humain. *Bulletin de la Société médicale d'Afrique noire de langue française*, 16, 321-322.

- Castets, M. and H. Sarrat, 1969a: Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note). *Bulletin de la Societe medicale d'Afrique noire de langue francaise*, 14, 693-696.
- Ciftci, E., A. Ilgazli, B. Gulleroglu, I. Ara and G. Akansel, 2005: Ultrasonographic measurement of the tuberculin skin test: comparison with manual reading. *Infectious diseases in clinical practice*, 13, 20-23.
- Cima, G., 2014: Cat transmits TB to humans in UK. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244, 1116.
- Clancey, J. K., 1977: The incidence of tuberculosis in Lechwe (*marsh antelope*). *Tubercle*, 58, 151-156.
- Claridge, J., P. Diggle, C. M. McCann, G. Mulcahy, R. Flynn, J. McNair, S. Strain, M. Welsh, M. Baylis and D. J. Williams, 2012: *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nature communications*, 3, 853.
- Clark, S., Y. Hall and A. Williams, 2014: Animal Models of Tuberculosis: Guinea Pigs. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 5.
- Cleaveland, S., T. Mlengeya, R. R. Kazwala, A. Michel, M. T. Kaare, S. L. Jones, E. Eblate, G. M. Shirima and C. Packer, 2005: Tuberculosis in Tanzanian wildlife. *Journal of wildlife diseases*, 41, 446-453.
- Clegg, T. A., A. Duignan, C. Whelan, E. Gormley, M. Good, J. Clarke, N. Toft and S. J. More, 2011: Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the γ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary microbiology*, 151, 68-76.
- Clifton-Hadley, R. S. and A. V. Goodchild, 2005: The fall and rise of bovine tuberculosis in Great Britain. *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans*.
- Coad, M., D. Clifford, S. G. Rhodes, R. G. Hewinson, H. M. Vordermeier and A. O. Whelan, 2010: Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary research*, 41, 14.
- Coad, M., D. J. Clifford, H. M. Vordermeier and A. O. Whelan, 2013: The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *The Veterinary record*, 172, 266.
- Coad, M., S. H. Downs, P. A. Durr, R. S. Clifton-Hadley, R. G. Hewinson, H. M. Vordermeier and A. O. Whelan, 2008: Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle missed by tuberculin skin testing. *The Veterinary record*, 162, 382-384.
- Coad, M., R. G. Hewinson, D. Clifford, H. M. Vordermeier and A. O. Whelan, 2007: Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary record*, 160, 660-662.
- Cockle, P. J., S. V. Gordon, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2006: Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 13, 1119-1124.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell, 1998: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-544.
- Coleman, J. D. and M. M. Cooke, 2001: *Mycobacterium bovis* infection in wildlife in New Zealand. *Tuberculosis*, 81, 191-202.
- Collins, F. M., 1971: Relative susceptibility of acid-fast and non-acid-fast bacteria to ultraviolet light. *Applied microbiology*, 21, 411-413.
- Collins, J. D., M. Monaghan, K. McGill, A. Kelly and T. Fitzsimons, 2000: A longitudinal study of cattle found positive to the interferon-gamma assay for *Mycobacterium bovis* infection. In: *Proceedings of the 9th Symposium of the International Society for Veterinary*

- Epidemiology and Economics*, Breckenridge (Colorado). 1263-1265.
- Comtet, L. and P. Pourquier, 2012: ID Screen® Interferon gamma ELISA: improvement of analytical sensitivity and introduction of a standard reference control to improve result interpretation. *Poster presented at the International Colloquium on Paratuberculosis*, Sydney (Australia).
- Conlan, A. J., E. Brooks Pollock, T. J. McKinley, A. P. Mitchell, G. J. Jones, M. Vordermeier and J. L. Wood, 2015: Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis. *PLoS Computational Biology*, 11, e1004038.
- Conlan, A. J., T. J. McKinley, K. Karolemeas, E. B. Pollock, A. V. Goodchild, A. P. Mitchell, C. P. Birch, R. S. Clifton-Hadley and J. L. Wood, 2012: Estimating the hidden burden of bovine tuberculosis in Great Britain. *PLoS Computational Biology*, 8, e1002730.
- Connolly, D. J., P. J. Dwyer, J. Fagan, M. Hayes, E. G. Ryan, E. Costello, A. Kilroy and S. J. More, 2008: Tuberculosis in an Alpaca *Lama pacos* on a farm in Ireland. 2. Results of an epidemiological investigation. *Irish veterinary journal*, 6, 533-537.
- Cook, A. J., L. M. Tuchili, A. Buve, S. D. Foster, P. Godfrey-Fausett, G. S. Pandey and K. P. McAdam, 1996: Human and bovine tuberculosis in the Monze District of Zambia--a cross-sectional study. *The British veterinary journal*, 152, 37-46.
- Cooney, R., J. Kazda, J. Quinn, B. Cook, K. Müller and M. Monaghan, 1997: Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculin. *Irish veterinary journal*, 50, 370-373.
- Corner, L., L. Melville, K. McCubbin, K. J. Small, B. S. McCormick, P. R. Wood and J. S. Rothel, 1990: Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian veterinary journal*, 67, 389-392.
- Corner, L. A., 1994: Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary microbiology*, 40, 53-63.
- Corner, L. A., 2006: The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary microbiology*, 112, 303-312.
- Corner, L. A. and A. C. Trajstman, 1988: An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesion. *Veterinary microbiology*, 18, 127-134.
- Cosivi, O., J. M. Grange, C. J. Daborn, M. C. Raviglione, T. Fujikura, D. Cousins, R. A. Robinson, H. F. Huchzermeyer, I. de Kantor and F. X. Meslin, 1998: Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging infectious diseases*, 4, 59-70.
- Costello, E., M. L. Doherty, M. L. Monaghan, F. C. Quigley and P. F. O'Reilly, 1998: A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary journal*, 155, 245-250.
- Courcoul, A., J. L. Moyen, L. Brugère, S. Faye, S. Hénault, H. Gares and M. L. Boschioli, 2014: Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PloS one*, 9, e90334.
- Courtenay, O., L. A. Reilly, F. P. Sweeney, V. Hibberd, S. Bryan, A. Ul-Hassan, C. Newman, D. W. McDonald, R. J. Delahay, G. J. Wilson and E. M. H. Wellington, 2006: Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biology letters*, 2, 460-462.
- Cousins, D. V., 2001: *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Revue scientifique et technique*, 20, 71-85.
- Cousins, D. V., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D. M. Collins, W. R. Butler, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M. I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga and A. Bernardelli, 2003: Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53, 1305-1314.
- Cousins, D. V. and N. Florisson, 2005: A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Revue scientifique et technique*, 24, 1039-1059.
- Cousins, D. V., B. R. Francis, R. Casey and C. Mayberry, 1993: *Mycobacterium bovis* infection in a goat. *Australian veterinary journal*, 70, 262-263.

- Crawshaw, T., R. Daniel, R. Clifton-Hadley, J. Clark, H. Evans, S. Rolfe and R. de la Rua-Domenech, 2008: TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary record*, 163, 127.
- Creed, R. F. S., 1982: The Circulatory System, the Skin, and the Cutaneous Organs of the Domestic Mammals. *Journal of Anatomy*, 135, 220.
- Cronan, M. R. and D. M. Tobin, 2014: Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. *Disease Model Mechanisms*, 7, 777-784.
- Cunha, M. V., M. Monteiro, P. Carvalho, P. Mendonca, T. Albuquerque and A. Botelho, 2011: Multihost tuberculosis: insights from the portuguese control program. *Veterinary medicine international*, 795165.
- Cvetnic, Z., V. Katalinic-Jankovic, B. Sostaric, S. Spicic, M. Obrovac, S. Marjanovic, M. Benic, B. K. Kirin and I. Vickovic, 2007: *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 11, 652-658.
- Chambers, M. A., K. Jahans, A. Whelan, C. Hughes, R. Sayers, A. Perkins and H. R. Glyn, 2002: Simple objective measurement of the cutaneous delayed-type hypersensitivity reaction to tuberculin using spectrophotometry. *Skin research and technology*, 8, 89-93.
- Chambers, M. A., A. Williams, D. Gavier-Widen, A. Whelan, C. Hughes, G. Hall, M. S. Lever, P. D. Marsh and R. G. Hewinson, 2001: A guinea pig model of low-dose *Mycobacterium bovis* aerogenic infection. *Veterinary microbiology*, 80, 213-226.
- Chan, J., S. Mehta, S. Bharrhan, Y. Chen, J. M. Achkar, A. Casadevall and J. Flynn, 2014: The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Seminars in Immunology*, 26, 588-600.
- Charleston, B., J. C. Hope, B. V. Carr and C. J. Howard, 2001: Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary record*, 149, 481-484.
- Chartier, C., P. Mercier, M. P. Pellet and J. Vialard, 2012: Effect of an inactivated paratuberculosis vaccine on the intradermal testing of goats for tuberculosis. *Veterinary journal*, 191, 360-363.
- Checkley, A. M. and H. McShane, 2011: Tuberculosis vaccines: progress and challenges. *Trends in pharmacological sciences*, 32, 601-606.
- Chen, Y. Y., C. W. Lin, W. F. Huang, J. R. Chang, I. J. Su, C. H. Hsu, H. Y. Cheng, S. C. Hsu and H. Y. Dou, 2014: Recombinant bacille Calmette-Guerin coexpressing Ag85b, CFP10, and interleukin-12 elicits effective protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of microbiology immunology and infection*.
- Chiari, M., M. Zanoni, L. G. Alborali, G. Zanardi, D. Avisani, S. Tagliabue, A. Gaffuri, M. L. Pacciarini and M. B. Boniotti, 2014: Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal genotype) from red deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *Journal of wildlife diseases*, 50, 330-333.
- Chilton, N. W., 1955: The Latin square design in clinical experimentation. *Journal of dental research*, 34, 421-428.
- Chiodini, R. J., W. M. Chamberlin, J. Sarosiek and R. W. McCallum, 2012: Crohn's disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association? *Critical reviews in microbiology*, 38, 52-93.
- Cho, Y. S., K. M. Dobos, J. Prenni, H. Yang, A. Hess, I. Rosenkrands, P. Andersen, S. W. Ryoo, G. H. Bai, M. J. Brennan, A. Izzo, H. Bielefeldt-Ohmann and J. T. Belisle, 2012: Deciphering the proteome of the in vivo diagnostic reagent "purified protein derivative" from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 12, 979-991.
- Cho, Y. S., S. C. Jung, J. M. Kim and H. S. Yoo, 2007: Enzyme-linked immunosorbent assay of bovine tuberculosis by crude mycobacterial protein 70. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 28, 409-418.
- D'Alterio, G. L., T. G. Knowles, E. I. Eknaes, I. E. Loevland and A. P. Foster, 2006: Postal survey of the population of South American camelids in the United Kingdom in 2000/01. *The Veterinary record*, 158, 86-90.
- da Silva, M. V., V. J. Massaro Junior, J. R. Machado, D. A. Silva, L. R. Castellano, P. B. Alexandre, D. B. Rodrigues and V. Rodrigues, 2015: Expression pattern of transcription factors and intracellular

- cytokines reveals that clinically cured tuberculosis is accompanied by an increase in mycobacterium-specific Th1, th2, and th17 cells. *BioMed research international*, 2015, 591237.
- Daffe, M. and P. Draper, 1998: The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*, 39, 131-203.
- Daniel, R., H. Evans, S. Rolfe, R. de la Rua-Domenech, T. Crawshaw, R. J. Higgins, A. Schock and R. Clifton-Hadley, 2009: Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain. *The Veterinary record*, 165, 335-342.
- Daszak, P., A. A. Cunningham and A. D. Hyatt, 2000: Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443-449.
- David, H. L., W. D. Jones, Jr. and C. M. Newman, 1971: Ultraviolet light inactivation and photoreactivation in the mycobacteria. *Infection and immunity*, 4, 318-319.
- Davis, J. M., H. Clay, J. L. Lewis, N. Ghori, P. Herbomel and L. Ramakrishnan, 2002: Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, 17, 693-702.
- Davis, J. M. and L. Ramakrishnan, 2009: The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, 136, 37-49.
- de Garine-Wichatitsky, M., A. Caron, C. Gomo, C. Foggin, K. Dutlow, D. Pfukenyi, E. Lane, S. Le Bel, M. Hofmeyr, T. Hlokwé and A. Michel, 2010: Bovine tuberculosis in buffaloes, Southern Africa. *Emerging infectious diseases*, 16, 884-885.
- de Kantor, I. N., A. C. Odeón, P. E. Steffan, M. J. Auza, C. R. Madrid and N. Marchevsky, 1984: Sensitivity of the cervical and the caudal fold tuberculin tests with *Mycobacterium bovis* in infected cattle of Argentina. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 3, 137-150.
- de Kantor, I. N. and V. Ritacco, 2006: An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary microbiology*, 112, 111-118.
- de la Cruz, M. L., A. Pérez, J. Bezós, E. Pagés, C. Casal, J. Carpintero, B. Romero, L. Domínguez, C. M. Barker, R. Díaz and J. Álvarez, 2014: Spatial dynamics of bovine tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010-2012). *PloS one*, 9, e115632.
- de la Rua-Domenech, R., 2006a: Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 86, 77-109.
- de la Rua-Domenech, R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen and R. S. Clifton-Hadley, 2006b: Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in veterinary science*, 81, 190-210.
- de Lisle, G. W., D. M. Collins, A. S. Loveday, W. A. Young and A. F. Julian, 1990: A report of tuberculosis in cats in New Zealand, and the examination of strains of *Mycobacterium bovis* by DNA restriction endonuclease analysis. *New Zealand veterinary journal*, 38, 10-13.
- de Lisle, G. W., C. G. Mackintosh and R. G. Bengis, 2001: *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Revue scientifique et technique*, 20, 86-111.
- de Val Pérez, B., S. López-Soria, M. Nofrarías, M. Martín, H. M. Vordermeier, B. Villarreal-Ramos, N. Romera, M. Escobar, D. Solanes, P. J. Cardona and M. Domingo, 2011: Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with *Mycobacterium caprae*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18, 1872-1881.
- de Vries, E., G. J. Lefeber, J. P. van der Weij, A. C. van Buijsen, P. C. P. C. Leijh and A. Cats, 1980: Pokeweed-mitogen induced lymphocyte proliferation: the effect of stimulation on mononuclear phagocytic cells. *Immunology*, 40, 177-182.
- Dean, G. S., T. R. Crawshaw, R. Rua-Domenech, L. Farrant, R. Greenwald, R. J. Higgins, K. Lyashchenko, H. M. Vordermeier and D. F. Twomey, 2009: Use of serological techniques for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in a llama herd. *The Veterinary record*, 165, 323-324.
- Dean, G. S., S. G. Rhodes, M. Coad, A. O. Whelan, P. J. Cockle, D. J. Clifford, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2005: Minimum

- infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infection and immunity*, 73, 6467-6471.
- Denny, G. O. and J. W. Wilesmith, 1999: Bovine tuberculosis in Northern Ireland: a case-control study of herd risk factors. *The Veterinary record*, 144, 305-310.
- Desvaux, S., M. Breton, D. Pugliese, S. Jean-Baptiste, M.-L. Lovato, F. Smyej, A. Grob, J. Befort and N. Keck, 2015: Situation épidémiologique vis-à-vis de la tuberculose des élevages de bovins dits « sauvages » de la zone Camargue : évolution depuis 2009 et bilan de l'utilisation du test de dépistage interféron. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 70, 9-13.
- Díaz-Otero, F., J. Padilla, L. Jaramillo, D. Gonzalez and C. Arriaga, 2008: Evaluation of BCG vaccine and *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins against bovine tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 306-308.
- Dinkla, E. T. B., J. Haagsma, J. V. Kuyvenhoven, J. Veen and J. H. M. Nieuwenhuijs, 1991: Tuberculosis in imported alpacas in the Netherlands – A zoonosis and further. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 116, 454-460.
- Dobbelaer, R., L. M. O'Reilly, A. Genicot and J. Haagsma, 1983: The potency of bovine PPD tuberculin in guinea-pigs and tuberculous cattle. *Journal of Biological Standardization*, 11, 213.
- Doherty, M. L., H. F. Bassett, P. J. Quinn, D. W. C. and M. L. Monaghan, 1995b: Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *American journal of veterinary research*, 56, , 1300-1306.
- Doherty, M. L., H. F. Bassett, P. J. Quinn, W. C. Davis, A. P. Kelly and M. L. Monaghan, 1996a: A sequential study of the bovine tuberculin reaction. *Immunology*, 87, 9-14.
- Doherty, M. L., M. L. Monaghan, H. F. Bassett and P. J. Quinn, 1995a: Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in veterinary science*, 58, 217-221.
- Doherty, M. L., M. L. Monaghan, H. F. Bassett, P. J. Quinn and W. C. Davis, 1996b: Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 49, 307-320.
- Domenech, P., A. S. Pym, M. Cellier, C. E. Barry, 3rd and S. T. Cole, 2002: Inactivation of the *Mycobacterium tuberculosis* RnpH orthologue (mntH) does not affect virulence in a mouse model of tuberculosis. *FEMS microbiology letters*, 207, 81-86.
- Domingo, M., O. Gil, E. Serrano, E. Guirado, M. Nofrarias, M. Grassa, N. Caceres, B. Perez, C. Vilaplana and P. J. Cardona, 2009: Effectiveness and safety of a treatment regimen based on isoniazid plus vaccination with *Mycobacterium tuberculosis* cells' fragments: field-study with naturally *Mycobacterium caprae*-infected goats. *Scandinavian journal of immunology*, 69, 500-507.
- Domingo, M., E. Vidal and A. Marco, 2014: Pathology of bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 97, S20-S29.
- Domogalla, J., W. M. Proding, H. Blum, S. Krebs, S. Gellert, M. Muller, E. Neuendorf, F. Sedlmaier and M. Buttner, 2013: Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *Journal of clinical microbiology*, 51, 1381-1388.
- Dondo, A. M., M. C. Gorla, M. Abete, C. G. Giammarino and L. Nicolandi, 1996: Effect of dexamethasone on gamma interferon test in cattle infected with *M. bovis*. 25-28.
- Downs, S. H., P. Durr, J. Edwards and R. Clifton-Hadley, 2008: Trace micro-nutrients may affect susceptibility to bovine tuberculosis in cattle. *Preventive veterinary medicine*, 87, 311-326.
- Duarte, E. L., M. Domingos, A. Amado and A. Botelho, 2008: Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary microbiology*, 130, 415-421.
- Duffield, B. J. and D. A. Young, 1985: Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Veterinary microbiology*, 10, 193-197.
- Duignan, A., M. Good and S. J. More, 2012: Quality control in the national bovine tuberculosis eradication programme in Ireland. *Revue scientifique et technique*, 31, 845-860.
- Dunn, J. R., J. B. Kaneene, D. L. Grooms, S. R. Bolin, C. A. Bolin and C. S. Bruning-Fann, 2005: Effects of positive results for

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 429-435.
- Dürr, S., B. Müller, S. Alonso, J. Hattendorf, C. J. Laisse, P. D. van Helden and J. Zinsstag, 2013: Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2399.
- Dvorska, L., L. Matlova, W. Y. Ayele, O. A. Fischer, T. Amemori, R. T. Weston, J. Alvarez, V. Beran, M. Moravkova and I. Pavlik, 2007: Avian tuberculosis in naturally infected captive water birds of the Ardeidae and Threskiornithidae families studied by serotyping, IS901 RFLP typing, and virulence for poultry. *Veterinary microbiology*, 119, 366-374.
- Ebani, V. V., F. Fratini, F. Bertelloni, D. Cerri and E. Tortoli, 2012: Isolation and identification of mycobacteria from captive reptiles. *Research in veterinary science*, 93, 1136-1138.
- EFSA, 2012: Scientific opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *EFSA journal* 10, 2975.
- EFSA, 2013: European Food Safety Agency (EFSA). Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. *EFSA Journal*, 11, 3475.
- EFSA, 2014: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2012. *EFSA journal*, 12, 312.
- EFSA, 2015: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13, 3991.
- Elias, K., D. Hussein, B. Asseged, T. Wondwossen and M. Gebeyehu, 2008: Status of bovine tuberculosis in Addis Ababa dairy farms. *Revue scientifique et technique*, 27, 915-923.
- Ellis, M. D., S. Davies, I. A. McCandlish, R. Monies, K. Jahans and R. de la Rua-Domenech, 2006: *Mycobacterium bovis* infection in a dog. *The Veterinary record*, 159, 46-48.
- Ellwood, D. C. and F. G. Waddington, 1972: A second experiment to challenge the resistance to tuberculosis in B.C.G. vaccinated cattle in Malawi. *The British veterinary journal*, 128, 619-626.
- Enfermedades de la Lista de la OIE, 2015: OIE - *World Organisation for Animal Health*, <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/>.
- Erler, W., G. Martin, K. Sachse, L. Naumann, D. Kahlau, J. Beer, M. Bartos, G. Nagy, Z. Cvetnic, M. Zolnir-Dovc and I. Pavlik, 2004: Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *Journal of clinical microbiology*, 42, 2234-2238.
- Erwin, P. C., D. A. Bemis, S. B. McCombs, L. L. Sheeler, I. M. Himelright, S. K. Halford, L. Diem, B. Metchock, T. F. Jones, M. G. Schilling and B. V. Thomsen, 2004: *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. *Emerging infectious diseases*, 10, 2258-2210.
- Fabri, M., S. Stenger, D. M. Shin, J. M. Yuk, P. T. Liu, S. Realegeno, H. M. Lee, S. R. Krutzik, M. Schenk, P. A. Sieling, R. Teles, D. Montoya, S. S. Iyer, H. Bruns, D. M. Lewinsohn, B. W. Hollis, M. Hewison, J. S. Adams, A. Steinmeyer, U. Zügel, G. Cheng, E. K. Jo, B. R. Bloom and R. L. Modlin, 2011: Vitamin D is required for IFN-g-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Science Translational Medicine*, 3, 104ra102.
- Facchini, L., E. Venturini, L. Galli, M. Martino and E. Chiappini, 2015: Vitamin D and tuberculosis: a review on a hot topic. *Journal of Chemotherapy*, 27, 128-138.
- Fan, L., H. Xiao, G. Mai, B. Su, J. Ernst and Z. Hu, 2015: Impaired *M. tuberculosis* antigen-specific IFN- γ response without IL-17 enhancement in patients with severe cavitary pulmonary tuberculosis. *PloS one*, 10, e0127087.
- Farnham, M. W., B. Norby, T. J. Goldsmith and S. J. Wells, 2012: Meta-analysis of field studies on bovine tuberculosis skin tests in United States cattle herds. *Preventive veterinary medicine*, 103, 234-242.
- Faye, S., J. L. Moyon, H. Gares, J. J. Benet, B. Garin-Bastuji and M. L. Boschirola, 2011: Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFN γ assay (Bovigam®) in a low prevalence

- area in France. *Veterinary microbiology*, 151, 1-2.
- Fenton, K. A., S. D. Fitzgerald, J. B. Kaneene, J. M. Kruger, R. Greenwald and K. P. Lyashchenko, 2010: Comparison of three immunodiagnostic assays for antemortem detection of *Mycobacterium bovis* stimulation in domestic cats. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 22, 724-729.
- Fenton, M. J., M. W. Vermeulen, S. Kim, M. Burdick, R. M. Strieter and H. Kornfeld, 1997: Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 65, 5149-5156.
- Fernández-Villar, A., A. Goris, M. Otero, N. Choucino, R. Vázquez, M. J. Muñoz and L. Pineiro, 2004: Conservation of purified protein derivative RT-23 tuberculin. *Archivos de Bronconeumología*, 40, 301-303.
- Fifis, T., L. A. Corner, J. S. Rothel and P. R. Wood, 1994: Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scandinavian journal of immunology*, 39, 267-274.
- Fifis, T., C. Costopoulos, L. A. Corner and P. R. Wood, 1992: Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Veterinary microbiology*, 30, 343-354.
- Fitzgerald, S. D. and J. B. Kaneene, 2013: Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide: hosts, pathology, surveillance, and control. *Veterinary pathology*, 50, 488-499.
- Flohr, C., M. Khan, I. H. Leach, I. D. Johnston and J. S. English, 2009: Cutaneous tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* lasting for more than 60 years. *Clinical and experimental dermatology*, 34, 921-923.
- Flores-Villalva, S., F. Suárez-Güemes, C. Espitia, A. O. Whelan, M. Vordermeier and J. A. Gutiérrez-Pabello, 2012: Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19, 797-803.
- Flynn, J., L. Tsenova, A. Izzo and G. Kaplan, 2008: Experimental animal models of tuberculosis. *Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag*, 389-426.
- Flynn, J. L., 2004: Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis*, 84, 93-101.
- Flynn, J. L. and J. Chan, 2001: Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology*, 19, 93-129.
- Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart and B. R. Bloom, 1993: An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*, 178, 2249-2254.
- Flynn, R. J., C. Mannion, O. Golden, O. Hacariz and G. Mulcahy, 2007: Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infection and immunity*, 75, 1373-1381.
- Forshaw, D. and G. R. Phelps, 1991: Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds. *Journal of wildlife diseases*, 27, 288-295.
- Fowler, M. E., 1996: Husbandry and diseases of camelids. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, 15, 155-169.
- Francis, J., 1947: Bovine tuberculosis: including a contrast with human tuberculosis. *Staples Press, London, UK*.
- Francis, J., 1958: Tuberculosis in animals and man: a study in comparative pathology. *Cassel & Coll. Ltd, London, UK*.
- Francis, J., R. J. Seiler, I. W. Wilkie, D. O'Boyle, M. J. Lumsden and A. J. Frost, 1978: The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *The Veterinary record*, 103, 420-425.
- Frothingham, R. and W. A. Meeker-O'Connell, 1998: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144 (Pt 5), 1189-1196.
- Gallagher, J. and R. S. Clifton-Hadley, 2000: Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Research in veterinary science*, 69, 203-217.
- Garbaccio, S., A. Macías, E. Shimizu, F. Paolicchi, N. Pezzone, G. Magnano, L. Zapata, A. Abdala, H. Tarabla, M. Peyru, K. Caimi, M. Zumarraga, A. Canal and A. Cataldi, 2014: Association between spoligotype-

- VNTR types and virulence of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Virulence*, 5, 297-302.
- García-Bocanegra, I., I. Barranco, I. M. Rodríguez-Gómez, B. Pérez, J. Gómez-Laguna, S. Rodríguez, E. Ruiz-Villamayor and A. Perea, 2010: Tuberculosis in alpacas (*Lama pacos*) caused by *Mycobacterium bovis*. *Journal of clinical microbiology*, 48, 1960-1964.
- García-Jiménez, W. L., J. M. Benítez-Medina, P. Fernández-Llario, J. A. Abecia, A. García-Sánchez, R. Martínez, D. Risco, A. Ortiz-Pelaez, F. J. Salguero, N. H. Smith, L. Gómez and J. Hermoso de Mendoza, 2013: Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and emerging diseases*, 60, 102-109.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon and R. G. Hewinson, 2003: The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7877-7882.
- Garrido, J. M., P. Vázquez, E. Molina, J. M. Plazaola, I. A. Sevilla, M. V. Geijo, M. Alonso-Hearn and R. A. Juste, 2013: Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PloS one*, 8, e80985.
- Gelman, A. and J. Hill, 2007: Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models. Cambridge University Press, New York, USA.
- Gelman, A. and D. B. Rubin, 1992: Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science*, 7, 457-511.
- Gell, P. G. and R. R. Coombs, 1963: The classification of allergic reactions underlying disease. In *Clinical aspects of immunology*.
- Glover, R. E., 1946: Susceptibility of the golden hamster (*Cricetus auratus*) to *Mycobacterium tuberculosis hominis* and *bovis*. *The journal of pathology and bacteriology*, 58, 107-110.
- Goff, B. S., 1996: Effect of dexamethasone treatment of tuberculous cattle on results of the gamma-interferon test for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 53, 39-47.
- González-Juarrero, M., A. Bosco-Lauth, B. Podell, C. Soffler, E. Brooks, A. Izzo, J. Sánchez-Campillo and R. Bowen, 2013: Experimental aerosol *Mycobacterium bovis* model of infection in goats. *Tuberculosis*, 93, 558-564.
- Gonzalo-Asensio, J., S. Mostowy, J. Harders-Westerveen, K. Huygen, R. Hernández-Pando, J. Thole, M. Behr, B. Gicquel and C. Martín, 2008: PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PloS one*, 3, e3496.
- Good, M., T. A. Clegg, E. Costello and S. J. More, 2011b: The comparative performance of the single intradermal test and the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies. *Veterinary journal*, 190, e60-65.
- Good, M., T. A. Clegg, F. Murphy and S. J. More, 2011a: The comparative performance of the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations from different manufacturers. *Veterinary microbiology*, 151, 77-84.
- Good, M. and A. Duignan, 2011: Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Veterinary medicine international*, 2011c, 410470.
- Goodchild, A. V. and R. S. Clifton-Hadley, 2001: Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81, 23-41.
- Goodchild, A. V., S. H. Downs, P. Upton, J. L. Wood and R. de la Rua-Domenech, 2015: Specificity of the comparative skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *The Veterinary record*, 177, 258.
- Gordon, S. V., R. Brosch, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier and S. T. Cole, 1999: Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular microbiology*, 32, 643-655.
- Gormley, E. and L. A. Corner, 2013a: Control strategies for wildlife tuberculosis in

- Ireland. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 1, 128-135.
- Gormley, E., L. A. Corner, E. Costello and S. Rodríguez-Campos, 2014: Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in veterinary science*, 97 Suppl, S30-43.
- Gormley, E., M. Doyle, A. Duignan, M. Good, S. J. More and T. A. Clegg, 2013b: Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN γ) assay. *Veterinary research*, 44, 117.
- Gormley, E., M. B. Doyle, T. Fitzsimons, K. McGill and Collins J. D., 2006: Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary microbiology*, 25, 171-179.
- Gormley, E., M. B. Doyle, K. McGill, E. Costello, M. Good and J. D. Collins, 2004: The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102, 413-420.
- Gorocica, P., M. C. Jiménez-Martínez, Y. Garfias, I. Sada and R. Lascrain, 2005: Structural components of the envelope of *Mycobacterium tuberculosis* that intervene in the pathogenesis of tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, 18.
- Gortázar, C., M. J. Torres, J. Vicente, P. Acevedo, M. Reglero, J. de la Fuente, J. J. Negro and J. Aznar-Martín, 2008: Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PloS one*, 3, e2776.
- Gortázar, C., J. Vicente, M. Boadella, C. Ballesteros, R. C. Galindo, J. Garrido, A. Aranaz and J. de la Fuente, 2011: Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary microbiology*, 151, 170-178.
- Gortázar, C., J. Vicente, S. Samper, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, P. Gavin, R. A. Juste, C. Martín, P. Acevedo, M. De La Puente and U. Hofle, 2005: Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary research*, 36, 43-52.
- Grange, J. M., 2001: *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*, 81, 71-77.
- Grange, J. M., J. Gibson, T. W. Osborn, C. H. Collins and M. D. Yates, 1983: What is BCG? *Tubercle*, 64, 129-139.
- Grange, J. M. and M. D. Yates, 1994: Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary microbiology*, 40, 137-151.
- Green, L. R., C. C. Jones, A. L. Sherwood, I. V. Garkavi, G. A. Cangelosi, T. C. Thacker, M. V. Palmer, W. R. Waters and C. V. Rathe, 2009: Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 16, 1309-1313.
- Greenwald, R., O. Lyashchenko, J. Esfandiari, M. Miller, S. Mikota, J. H. Olsen, R. Ball, G. Dumonceaux, D. Schmitt, T. Moller, J. B. Payeur, B. Harris, D. Sofranko, W. R. Waters and K. P. Lyashchenko, 2009: Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 16, 605-612.
- Griffin, J. M., 1993a: The role of bought-in cattle in herd breakdowns due to tuberculosis in part of County Cavan during 1989. *Irish veterinary journal*, 46, 143-148.
- Griffin, J. M. and L. A. Dolan, 1995: The role of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in the Republic of Ireland: a review. *Irish veterinary journal*, 48, 228-234.
- Griffin, J. M., T. Haheisy, K. Lynch, M. D. Salman, J. McCarthy and T. Hurley, 1993b: The association of cattle husbandry characteristics, environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 17, 145-160.
- Guilbride, P. D., 1963: Skin lesion tuberculosis in indigenous cattle in Uganda. *Bulletin of epizootic diseases of Africa*, 11, 177-183.
- Gunn-Moore, D. A., S. E. McFarland, J. I. Brewer, T. R. Crawshaw, R. S. Clifton-Hadley, M. Kovalik and D. J. Shaw, 2011: Mycobacterial disease in cats in Great Britain: I. Culture results, geographical distribution and clinical presentation of

- 339 cases. *Journal of feline medicine and surgery*, 13, 934-944.
- Gutiérrez, M., S. Samper, M. S. Jiménez, J. D. van Embden, J. F. Marín and C. Martín, 1997: Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 35, 3328-3330.
- Gutiérrez, M., J. Tellechea and J. F. García Marín, 1998: Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary microbiology*, 62, 281-290.
- Haagsma, J., 1986: Potency testing of bovine tuberculins. *Developments in biological standardization*, 58 (Pt B), 689-694.
- Haagsma, J. and A. Eger, 1995: Quality testing of tuberculins and its practical consequences for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Proceedings of the 2nd International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and the Middle-East, Rabat* (Marruecos). October 1995.
- Habarugira, G., J. Rukelibuga, M. O. Nanyingi and B. Mushonga, 2014: Bovine tuberculosis in Rwanda: Prevalence and economic impact evaluation by meat inspection at Société des Abattoirs de Nyabugogo-Nyabugogo Abattoir, Kigali. *Journal of the South Africa veterinary association*, 85, 1062.
- Hadorn, D. C. and K. D. Stark, 2008: Evaluation and optimization of surveillance systems for rare and emerging infectious diseases. *Veterinary research*, 39, 57.
- Halliday, R., 1985: Inmunidad y salud en recién nacidos. *Editorial Am Vet JI*.
- Hanna, J., S. D. Neill and J. J. O'Brien, 1992: ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 31, 243-249.
- Hansen, O. G., K. Lindqvist and H. Waaler, 1964: Assessment of the potency of tuberculin in humans and guinea-pigs. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 171-182.
- Harboe, M. and S. Nagai, 1984: MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *The American review of respiratory disease*, 129, 444-452.
- Harboe, M., H. G. Wiker, J. R. Duncan, M. M. Garcia, T. W. Dukes, B. W. Brooks, C. Turcotte and S. Nagai, 1990: Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 28, 913-921.
- Hardstaff, J. L., G. Marion, M. R. Hutchings and P. C. White, 2014: Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe. *Research in veterinary science*, 97 Suppl, S86-93.
- Harrison, D. K., N. C. Abbot, J. S. Beck and M. P.T., 1993: A preliminary assessment of laser Doppler perfusion imaging in human skin using the tuberculin reaction as a model. *Physiological measurement*, 14, 241-252.
- Haydon, D. T., S. Cleaveland, L. H. Taylor and M. K. Laurenson, 2002: Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases*, 8, 1468-1473.
- Hernández-Garay, M. and P. Méndez-Samperio, 2003: Transforming grown factor-beta decreases survival of *Mycobacterium bovis*-activated T cells. *Archives of medical research*, 34, 20-25.
- Hershberg, R., M. Lipatov, P. M. Small, H. Sheffer, S. Niemann, S. Homolka, J. C. Roach, K. Kremer, D. A. Petrov, M. W. Feldman and S. Gagneux, 2008: High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS biology*, 6, e311.
- Hewison, M., 2011: Antibacterial effects of vitamin D. *Nature Reviews. Endocrinology*, 7, 337-345.
- Hiko, A. and G. E. Agga, 2011: First-time detection of mycobacterium species from goats in Ethiopia. *Tropical animal health and production*, 43, 133-139.
- Himsworth, C. G., B. T. Elkin, J. S. Nishi, A. S. Neimanis, G. A. Wobeser, C. Turcotte and F. A. Leighton, 2010: An outbreak of bovine tuberculosis in an intensively managed conservation herd of wild bison in the Northwest Territories. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 51, 593-597.
- Hines, N., J. B. Payeur and L. J. Hoffman, 2006: Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 18, 243-250.
- Hirsch, C. S., J. J. Ellner, R. Blinkhorn and Z. Toossi, 1997: In vitro restoration of T cell

- responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3926-3931.
- Ho, M. M., S. K. Kairo and M. J. Corbel, 2006: Tuberculin purified protein derivative (PPD) immunoassay as an in vitro alternative assay for identity and confirmation of potency. *Human vaccines*, 2, 29-33.
- Hogg, A., M. Huante, A. Ongaya, J. Williams, M. Ferguson, M. Cloyd, E. Amukoye and J. Endsley, 2011: Activation of NK cell granulysin by mycobacteria and IL-15 is differentially affected by HIV. *Tuberculosis*, 91 Suppl 1, S75-81.
- Holani, A. G., S. M. Ganvir, N. N. Shah, S. C. Bansode, I. Shende, R. Jawade and S. C. Bijjargi, 2014: Demonstration of *mycobacterium tuberculosis* in sputum and saliva smears of tuberculosis patients using ziehl neelsen and flurochrome staining- a comparative study. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 8, ZC42-45.
- Hoop, R. K., 2002: *Mycobacterium tuberculosis* infection in a canary (*Serinus canana* L.) and a blue-fronted Amazon parrot (*Amazona amazona aestiva*). *Avian diseases*, 46, 502-504.
- Hope, J. C., M. L. Thom, M. McAulay, E. Mead, H. M. Vordermeier, D. Clifford, R. G. Hewinson and B. Villarreal-Ramos, 2011: Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18, 373-379.
- Hope, J. C., M. L. Thom, B. Villarreal-Ramos, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson and C. J. Howard, 2005a: Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clinical and experimental immunology*, 139, 48-56.
- Hope, J. C., M. L. Thom, B. Villarreal-Ramos, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson and C. J. Howard, 2005b: Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clinical and experimental immunology*, 141, 432-439.
- Hope, J. C. and B. Villarreal-Ramos, 2008: Bovine TB and the development of new vaccines. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 31, 77-100.
- Huard, R. C., M. Fabre, P. de Haas, L. C. Lazzarini, D. van Soolingen, D. Cousins and J. L. Ho, 2006: Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology*, 188, 4271-4287.
- Humblet, M. F., M. L. Boschioli and C. Saegerman, 2009: Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Veterinary research*, 40, 50.
- Humblet, M. F., J. L. Moyon, P. Bardoux, M. L. Boschioli and C. Saegerman, 2011b: The importance of awareness for veterinarians involved in cattle tuberculosis skin testing. *Transboundary and emerging diseases*, 58, 531-536.
- Humblet, M. F., K. Walravens, O. Salandre, M. L. Boschioli, M. Gilbert, D. Berkvens, M. Fauville-Dufaux, J. Godfroid, J. Dufey, A. Raskin, L. Vanholme and C. Saegerman, 2011a: Monitoring of the intra-dermal tuberculosis skin test performed by Belgian field practitioners. *Research in veterinary science*, 91, 199-207.
- Inangolet, F. O., B. Demelash, J. Oloya, J. Opuda-Asibo and E. Skjerve, 2008: A cross-sectional study of bovine tuberculosis in the transhumant and agro-pastoral cattle herds in the borde rareas of Katakwi and Moroto districts, Uganda. *Tropical animal health and production*, 40, 501-508.
- Jacobs, E. C., 1957: Tuberculosis: yet an unconquered disease. *Military medicine*, 120, 1-13.
- Jasenosky, L. D., T. J. Scriba, W. A. Hanekom and A. E. Goldfeld, 2015: T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological reviews*, 264, 74-87.
- Je, S., U. C. Yeo, T. Song, K. C. Kim, S. Y. Park, M. J. Kim and S. N. Cho, 2014: Extent of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle herds subject to partial culling as determined by an interferon-gamma assay. *Journal of veterinary science*, 15, 259-265.

- Jee, B., V. M. Katoch and S. K. Awasthi, 2008: Dissection of relationship between small heat shock proteins and mycobacterial diseases. *Indian journal of leprosy*, 80, 231-245.
- Jenkins, A. O., S. I. Cadmus, E. H. Venter, C. Pourcel, Y. Hauk, G. Vergnaud and J. Godfroid, 2011: Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Veterinary microbiology*, 151, 139-147.
- Johnson, L., G. Dean, S. Rhodes, G. Hewinson, M. Vordermeier and A. Wangoo, 2007: Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis*, 87, 71-76.
- Jones, G. J., R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2010a: Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 17, 1344-1348.
- Jones, G. J., C. Pirson, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2010b: Simultaneous measurement of antigen-stimulated interleukin-1 beta and gamma interferon production enhances test sensitivity for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 17, 1946-1951.
- Jones, G. J., A. Whelan, D. Clifford, M. Coad and H. M. Vordermeier, 2012: Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19, 620-622.
- Jones, T. O., 2012: Role of liver fluke infection in hindering detection of bovine TB. *The Veterinary record*, 170, 630.
- Jorge, M. C., D. M. Schettino, P. Torres and A. Bernardelli, 2000: First description of concomitant infection with tuberculosis and paratuberculosis in dairy sheep in Argentina. *Revue scientifique et technique*, 19, 800-809.
- Jurczynski, K., K. P. Lyashchenko, D. Gomis, I. Moser, R. Greenwald and P. Moisson, 2011: Pinniped tuberculosis in Malayan tapirs (*Tapirus indicus*) and its transmission to other terrestrial mammals. *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 42, 222-227.
- Juste, R. A. and V. Perez, 2011: Control of paratuberculosis in sheep and goats. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 27, 127-138.
- Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal and L. van Embden, 1997: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*, 35, 907-914.
- Kaneene, J. B., C. S. Bruning-Fann, L. M. Granger, R. Miller and B. A. Porter-Spalding, 2002: Environmental and farm management factors associated with tuberculosis on cattle farms in northeastern Michigan. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221, 837-842.
- Kao, R. R., M. G. Roberts and T. J. Ryan, 1997: A model of bovine tuberculosis control in domesticated cattle herds. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 264, 1069-1076.
- Karlson, A. G. and E. F. Lessel, 1970: *Mycobacterium bovis* nom. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 20, 273-282.
- Karolemeas, K., R. de la Rua-Domenech, R. Cooper, A. V. Goodchild, R. S. Clifton-Hadley, A. J. Conlan, A. P. Mitchell, R. G. Hewinson, C. A. Donnelly, J. L. Wood and T. J. McKinley, 2012: Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS one*, 7, e43217.
- Kazwala, R. R., D. M. Kambarage, C. J. Daborn, J. Nyange, S. F. Jiwa and J. M. Sharp, 2001: Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in the Southern Highlands of Tanzania. *Veterinary research communications*, 25, 609-614.
- Keck, N., H. Dutruel, F. Smyej, M. Nodet and M. L. Boschioli, 2010: Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in a Camargue horse. *The Veterinary record*, 166, 499-500.
- Keck, N., M. C. Tiffay, S. Desvaux, F. Smyej, M. L. Boschioli, B. Durand and V. Vogler, 2012: Bilan du dépistage généralisé de la tuberculose bovine par le test interféron

- gamma en Camargue. *Le Point Vet*, 329, 66-70.
- Keeling, M. J. and P. Rohani, 2008: Modeling infectious diseases in humans and animals. NJ, USA: Princeton University Press.
- Kehrli, M. E. J., B. J. Nonnecke and J. A. Roth, 1989: Alterations in bovine lymphocyte function during the peripartum period. *American journal of veterinary research*, 50, 215-220.
- Kelly, P., H. Jahns, E. Power, J. Bainbridge, K. Kenny, J. M. Corpa, J. P. Cassidy and J. J. Callanan, 2013: Mycobacteriosis in ostriches (*Struthio camelus*) due to infection with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex. *Avian diseases*, 57, 808-811.
- Kelly, W. R. and J. D. Collins, 1978: The health significance of some infectious agents present in animal effluents. *Veterinary research communications*, 2, 95-103.
- Kerr, W. R., H. G. Lamont and G. J. Mc, 1946a: Studies on tuberculin sensitivity in the bovine; introduction. *The Veterinary record*, 58, 443-446.
- Kerr, W. R., H. G. Lamont and G. J. Mc, 1946b: Studies on tuberculin sensitivity in the bovine; the Stormont test. *The Veterinary record*, 58, 451-454.
- Kerr, W. R., H. G. Lamont and J. L. McGirr, 1949: Further studies on tuberculin sensitivity in the bovine. *The Veterinary record*, 61, 466-475.
- Khatiri, B. L., M. Coad, D. J. Clifford, R. G. Hewinson, A. O. Whelan and H. M. Vordermeier, 2012: A natural-transmission model of bovine tuberculosis provides novel disease insights. *The Veterinary record*, 171, 448.
- Kindt, J. T., A. R. Goldsby, B. A. Osborne and J. Kuby, 2007: Kuby immunology 6th ed.
- Kipar, A., S. J. Burthe, U. Hetzel, M. A. Rokia, S. Telfer, X. Lambin, R. J. Birtles, M. Begon and M. Bennett, 2014: *Mycobacterium microti* Tuberculosis in its maintenance host, the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Veterinary pathology*, 51, 903-914.
- Koch, R., 1982: Die aetiologie der tuberculose. *Berliner klinische Wochenschrift* 19, 221-230.
- Koh, W. J., Y. Ko, C. K. Kim, K. S. Park and N. Y. Lee, 2012: Rapid diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance using a MGIT 960 system. *Annals of laboratory medicine*, 32, 264-269.
- Kohler, H., H. Gyra, K. Zimmer, K. G. Drager, B. Burkert, B. Lemser, D. Hausleithner, K. Cubler, W. Klawonn and R. G. Hess, 2001: Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 48, 185-195.
- Koller-Jones, M. A., 2010: National Bovine Tuberculosis (TB) Eradication Program. Canadian Food Inspection Agency. 1-16.
- Koo, H. C., Y. H. Park, J. Ahn, W. R. Waters, M. V. Palmer, M. J. Hamilton, G. Barrington, A. A. Mosaad, K. T. Park, W. K. Jung, I. Y. Hwang, S. N. Cho, S. J. Shin and W. C. Davis, 2005: Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 43, 4498-4506.
- Koo, H. C., Y. H. Park, M. J. Hamilton, G. M. Barrington, C. J. Davies, J. B. Kim, J. L. Dahl, W. R. Waters and W. C. Davis, 2004: Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. *Infection and immunity*, 72, 6870-6883.
- Krishnan, N., W. Malaga, P. Constant, M. Caws, T. H. Tran, J. Salmons, T. N. Nguyen, D. B. Nguyen, M. Daffe, D. B. Young, B. D. Robertson, C. Guilhot and G. E. Thwaites, 2011: *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles. *PloS one*, 6, e23870.
- Kubica, T., S. Rusch-Gerdes and S. Niemann, 2003: *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *Journal of clinical microbiology*, 41, 3070-3077.
- Kukielka, E., J. A. Barasona, C. E. Cowie, J. A. Drewe, C. Gortazar, I. Cotarelo and J. Vicente, 2013: Spatial and temporal interactions between livestock and

- wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Preventive veterinary medicine*, 112, 213-221.
- Kulberg, S., P. Boysen and A. K. Storset, 2004: Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood. *Developmental and comparative immunology*, 28, 941-948.
- Kumar, D., P. Tiwary, J. Chakravarty and S. Sundar, 2014: Association of interleukin-18 gene polymorphism with susceptibility to visceral leishmaniasis in endemic area of Bihar, an Indian population. *Scientific World Journal*, 2014, 852104.
- Lamine-Khemiri, H., R. Martinez, W. L. Garcia-Jimenez, J. M. Benitez-Medina, M. Cortes, I. Hurtado, M. S. Abassi, I. Khazri, M. Benzarti and J. Hermoso-de-Mendoza, 2014: Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia. *Tropical animal health and production*, 46, 305-311.
- Lamont, H. G., 1947: Tuberculin testing. *The Veterinary record*, 59, 407-409.
- Lantos, A., S. Niemann, L. Mezosi, E. Sos, K. Erdelyi, S. David, L. M. Parsons, T. Kubica, S. Rusch-Gerdes and A. Somoskovi, 2003: Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. *Emerging infectious diseases*, 9, 1462-1464.
- Larsen, A. B., A. H. Groth and H. W. Johnson, 1950: Allergic response to johnin and tuberculin of various skin regions of cattle. *American journal of veterinary research*, 11, 301-303.
- Larsen, D. G., 2015: A reliable ruminant for research. *Lab animal*, 44, 337.
- le Roex, N., A. P. Koets, P. D. van Helden and E. G. Hoal, 2013a: Gene polymorphisms in African buffalo associated with susceptibility to bovine tuberculosis infection. *PLoS one*, 8, e64494.
- le Roex, N., P. D. van Helden, A. P. Koets and E. G. Hoal, 2013b: Bovine TB in livestock and wildlife: what's in the genes? *Physiological genomics*, 45, 631-637.
- Leng, J., Y. Ding, C. Shou, Z. Wu, G. Zhuo, K. Wang, J. Shen and S. Huang, 2014: Development of a novel anti ESAT-6 monoclonal antibody for screening of *Mycobacterium tuberculosis*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7, 4238-4243.
- Lepper, A. W. and L. A. Corner, 1976: Suppression of reactivity to bovine PPD tuberculin in cattle tested in both caudal folds: a possible source of error in tuberculin trials. *Australian veterinary journal*, 52, 296-297.
- Lepper, A. W., D. A. Newton-Tabrett, L. A. Corner, M. T. Carpenter, W. A. Scanlan, O. J. Williams and D. M. Helwig, 1977a: The use of bovine PPD tuberculin the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. *Australian veterinary journal*, 53, 208-213.
- Lepper, A. W., C. W. Pearson and L. A. Corner, 1977b: Anergy to tuberculin in beef cattle. *Australian veterinary journal*, 53, 214-216.
- Lesslie, I. W., C. N. Hebert, K. J. Burn, B. N. MacClancy and W. J. C. Donnelly, 1975c: Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle [a series of three related articles]. *The Veterinary record*, 96, 332-341.
- Lesslie, I. W., C. N. Herbert and D. N. Barnett, 1975b: Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. 2. South-eastern England. *The Veterinary record*, 96, 335-338.
- Lesslie, I. W., C. N. Herbert, K. J. Burn, B. N. MacClancy and W. J. Donnelly, 1975a: Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. 1--Republic of Ireland. *The Veterinary record*, 96, 332-334.
- Li, D. D., L. Q. Jia, S. J. Guo, Y. C. Shen and F. Q. Wen, 2013: Interleukin-18 promoter gene -607C/A polymorphism and tuberculosis risk: a meta-analysis. *Chinese medical journal* 126, 3360-3363.
- Liébana, E., A. Aranaz, J. J. Urquía, A. Mateos and L. Domínguez, 1998: Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Australian veterinary journal*, 76, 50-53.
- Liébana, E., R. M. Girvin, M. Welsh, S. D. Neill and J. M. Pollock, 1999: Generation of CD8(+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infection and immunity*, 67, 1034-1044.
- Lightbody, K. A., J. McNair, S. D. Neill and J. M. Pollock, 2000: IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in

- immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Veterinary microbiology*, 75, 177-188.
- Lightbody, K. A., R. A. Skuce, S. D. Neill and J. M. Pollock, 1998: Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *The Veterinary record*, 142, 295-300.
- Lilenbaum, W., E. R. Ribeiro, G. N. Souza, E. C. Moreira, L. S. Fonseca, M. A. Ferreira and J. Schettini, 1999a: Evaluation of an ELISA-PPD for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Research in veterinary science*, 66, 191-195.
- Lilenbaum, W., J. C. Schettini, G. N. Souza, E. R. Ribeiro, E. C. Moreira and L. S. Fonseca, 1999b: Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentralbl Veterinarmed B*, 46, 353-358.
- Lillebaek, T., W. Bergstedt, P. N. Tingskov, B. Thierry-Carstensen, H. Aggerbeck, S. T. Hoff, K. Weldingh, P. Andersen, B. Soborg, V. O. Thomsen and A. B. Andersen, 2009: Risk of sensitization in healthy adults following repeated administration of rESAT-6 skin test reagent by the Mantoux injection technique. *Tuberculosis*, 89, 158-162.
- Lin, P. L. and J. L. Flynn, 2015: CD8 T cells and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Semin Immunopathol*, 37, 239-249.
- Liu, Q., W. Li, D. Li, Y. Feng and C. Tao, 2015: The association of interleukin-10 -1082, -819, -592 polymorphisms and tuberculosis risk. *Saudi medical journal*, 36, 407-417.
- LoBue, P. A., D. A. Enarson and C. O. Thoen, 2010: Tuberculosis in humans and animals: an overview. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 14, 1075-1078.
- Locke, H. and J. Fishwick, 2011: Preventing TB fraud. *The Veterinary record*, 168, 386.
- Loeffler, S. H., G. W. de Lisle, M. A. Neill, D. M. Collins, M. Price-Carter, B. Paterson and K. B. Crews, 2014: The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. *Journal of wildlife diseases*, 50, 180-187.
- Lomme, J. R., C. O. Thoen, E. M. Himes, J. W. Vinson and R. E. King, 1976: *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169, 912-914.
- Long, D. A., M. D. Lond, A. A. Miles and M. A. Camb, 1950: Opposite actions of thyroid and adrenal hormones in allergic hypersensitivity. *The Lancet*, 255, 492-495.
- Lopez-Valencia, G., T. Renteria-Evangelista, J. Williams Jde, A. Licea-Navarro, L. Mora-Valle Ade and G. Medina-Basulto, 2010: Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 88, 44-49.
- Lunn, D. J., A. Thomas, N. Best and D. Spiegelhalter, 2000: WinBUGS - a Bayesian modelling framework: concepts, structure and extensibility. *Statistics and computing* 10, 325-337.
- Lyashchenko, K., C. Manca, R. Colangeli, A. Heijbel, A. Williams and M. L. Gennaro, 1998: Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. *Infection and immunity*, 66, 3606-3610.
- Lyashchenko, K. P., R. Greenwald, J. Esfandiari, M. A. Chambers, J. Vicente, C. Gortazar, N. Santos, M. Correia-Neves, B. M. Buddle, R. Jackson, D. J. O'Brien, S. Schmitt, M. V. Palmer, R. J. Delahay and W. R. Waters, 2008: Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Veterinary microbiology*, 132, 283-292.
- Lyashchenko, K. P., R. Greenwald, J. Esfandiari, M. Meylan, I. H. Burri and P. Zanolari, 2007: Antibody responses in New World camelids with tuberculosis caused by *Mycobacterium microti*. *Veterinary microbiology*, 125, 265-273.
- Lyashchenko, K. P., R. Greenwald, J. Esfandiari, S. Rhodes, G. Dean, R. de la Rua-Domenech, M. Meylan, H. M. Vordermeier and P. Zanolari, 2011: Diagnostic value of animal-side antibody assays for rapid detection of *Mycobacterium bovis* or *Mycobacterium microti* infection in South American camelids. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18, 2143-2147.

- Lyashchenko, K. P., M. Singh, R. Colangeli and M. L. Gennaro, 2000: A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *Journal of immunological methods*, 242, 91-100.
- Lyashchenko, K. P., H. G. Wiker, M. Harboe, J. McNair, S. V. Komissarenko and J. M. Pollock, 2001: Novel monoclonal antibodies against major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian journal of immunology*, 53, 498-502.
- Mackay, C. R., M. F. Beya and P. Matzinger, 1989: Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *European journal of immunology*, 19, 1477-1483.
- Mackintosh, C. G., T. Qureshi, K. Waldrup, R. E. Labes, K. G. Dodds and J. F. Griffin, 2000: Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*). *Infection and immunity*, 68, 1620-1625.
- Machackova, M., L. Matlova, J. Lamka, J. Smolik, I. Melicharek, M. Hanzlikova, J. Docekal, Z. Cvetnik, G. Nagy, M. Lipiec, M. Ocepek and I. Pavlik, 2003: Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Veterinary Medicine (Czech)*, 48, 51-65.
- Maes, M., J. F. Gimenez, A. D'Alessandro and J. H. De Waard, 2011: The stability of human, bovine and avian tuberculin purified protein derivative (PPD). *Journal of infection in developing countries*, 5, 781-785.
- Magee, D. A., K. M. Conlon, N. C. Nalpas, J. A. Browne, C. Pirson, C. Healy, K. E. McLoughlin, J. Chen, H. M. Vordermeier, E. Gormley, D. E. MacHugh and S. V. Gordon, 2014: Innate cytokine profiling of bovine alveolar macrophages reveals commonalities and divergence in the response to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*, 94, 441-450.
- MAGRAMA, 2015: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para el año 2015-2016. <http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS/PROGRAMAS/2015/TUBERCULOSIS%20BOVINA/PROGRAMA%20TB%202015-2016.PDF>.
- Mahairas, G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh and C. K. Stover, 1996: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of bacteriology*, 178, 1274-1282.
- Malen, H., S. Pathak, T. Softeland, G. A. de Souza and H. G. Wiker, 2010: Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *BMC Microbiol*, 10, 132.
- Malone, F. E., E. C. Wilson, J. M. Pollock and R. A. Skuce, 2003: Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculous cattle. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 50, 500-504.
- Manabe, Y. C., A. M. Dannenberg, Jr., S. K. Tyagi, C. L. Hatem, M. Yoder, S. C. Woolwine, B. C. Zook, M. L. Pitt and W. R. Bishai, 2003a: Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infection and immunity*, 71, 6004-6011.
- Manabe, Y. C., A. M. J. Dannenberg, S. K. Tyagi, C. L. Hatem, M. Yoder, S. C. Woolwine, B. C. Zook, M. L. Pitt and W. R. Bishai, 2003b: Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infection and immunity*, 71, 6004-6011.
- Manning, E. J., H. F. Cushing, S. Hietala and C. B. Wolf, 2007: Impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on serologic surveillance for Johne's disease in goats. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 19, 187-190.
- Marassi, C., C. Almeida, S. Pinheiro, S. Vasconcellos and W. Lilenbaum, 2009: The use of MPB70-ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in Brazil. *Veterinary Research communications*, 33, 937-943.
- Marassi, C. D., L. Medeiros, J. McNair and W. Lilenbaum, 2011: Use of recombinant proteins MPB70 or MPB83 as capture antigens in ELISAs to confirm bovine

- tuberculosis infections in Brazil. *Acta tropica*, 118, 101-104.
- Marín, G. F., 1993: Report of meetings of IUATLD scientific committee on tuberculosis in animals. *International Union against Tuberculosis and Lung Disease Newsletter*, 14-16.
- Martin-Atance, P., F. Palomares, M. Gonzalez-Candela, E. Revilla, M. J. Cubero, J. Calzada and L. Leon-Vizcaino, 2005: Bovine tuberculosis in a free ranging red fox (*Vulpes vulpes*) from Donana National Park (Spain). *Journal of wildlife diseases*, 41, 435-436.
- Martín-Hernando, M. P., U. Hofle, J. Vicente, F. Ruiz-Fons, D. Vidal, M. Barral, J. M. Garrido, J. de la Fuente and C. Gortázar, 2007: Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87, 360-367.
- Martín, C., A. Williams, R. Hernandez-Pando, P. J. Cardona, E. Gormley, Y. Bordat, C. Y. Soto, S. O. Clark, G. J. Hatch, D. Aguilar, V. Ausina and B. Gicquel, 2006: The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* 24, 3408-3419.
- Martin, S. W., A. H. Meek and P. Willeberg, 1987: Veterinary Epidemiology: Principles and Methods.
- Maslow, J. N. and S. K. Mikota, 2015: Tuberculosis in elephants-a reemergent disease: diagnostic dilemmas, the natural history of infection, and new immunological tools. *Veterinary pathology*, 52, 437-440.
- Masood, K. I., R. Hussain, N. Rao, M. E. Rottenberg, N. Salahuddin, M. Irfan and Z. Hasan, 2014: Differential Early Secreted Antigen Target (ESAT) 6 kDa-induced IFN-gamma and SOCS1 expression distinguishes latent and active tuberculosis. *Journal of infection in developing countries*, 8, 59-66.
- Matsumoto, S., T. Matsuo, N. Ohara, H. Hotokezaka, M. Naito, J. Minami and T. Yamada, 1995: Cloning and sequencing of a unique antigen MPT70 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and expression in BCG using *E. coli*-mycobacteria shuttle vector. *Scandinavian journal of immunology*, 41, 281-287.
- Matsumoto, T. and T. Yamazaki, 2014: The evaluation of the utility of QuantiFERON TB-Gold In-Tube; QFT-GIT. *Kekkaku : [Tuberculosis]*, 89, 743-755.
- Matsuo, T., H. Matsuo, N. Ohara, S. Matsumoto, H. Kitaura, A. Mizuno and T. Yamada, 1996: Cloning and sequencing of an MPB70 homologue corresponding to MPB83 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Scandinavian journal of immunology*, 43, 483-489.
- Mayer, G., 2006: Cells of the Immune System and Antigen Recognition.
- McCorry, T., A. O. Whelan, M. D. Welsh, J. McNair, E. Walton, D. G. Bryson, R. G. Hewinson, H. M. Vordermeier and J. M. Pollock, 2005: Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *The Veterinary record*, 157, 613-618.
- McLeod, M. P., R. L. Warren, W. W. Hsiao, N. Araki, M. Myhre, C. Fernandes, D. Miyazawa, W. Wong, A. L. Lillquist, D. Wang, M. Dosanjh, H. Hara, A. Petrescu, R. D. Morin, G. Yang, J. M. Stott, J. E. Schein, H. Shin, D. Smailus, A. S. Siddiqui, M. A. Marra, S. J. Jones, R. Holt, B. F. S., M. K., F. M., Davies J. E, M. W. W and E. L. D., 2006: The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15582-15587.
- McMurray, D. N., C. L. Mintzer, R. A. Bartow and R. L. Parr, 1989: Dietary protein deficiency and *Mycobacterium bovis* BCG affect interleukin-2 activity in experimental pulmonary tuberculosis. *Infection and immunity*, 57, 2606-2611.
- McMurray, J., 1941: The Incidence of Bovine Tuberculosis in Humans in Northern Ireland. *The Ulster medical journal*, 10, 132-114 112.
- McNair, J., D. M. Corbett, R. M. Girvin, D. P. Mackie and J. M. Pollock, 2001: Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scandinavian journal of immunology*, 53, 365-371.
- McNair, J., M. D. Welsh and J. M. Pollock, 2007: The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved

- disease control strategies. *Vaccine*, 25, 5504-5511.
- Medina, E., L. Ryan, R. LaCourse and R. J. North, 2006: Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. *Tuberculosis*, 86, 20-27.
- Medley, G. F. and L. E. Green, 2013: Enhancing the sensitivity of tests for bovine TB. *The Veterinary record*, 172, 96-97.
- Menzies, F. D., D. A. Abernethy, L. A. Stringer, N. Honhold and A. W. Gordon, 2012: A matched cohort study investigating the risk of *Mycobacterium bovis* infection in the progeny of infected cows. *Veterinary journal*, 194, 299-302.
- Menzies, F. D. and S. D. Neill, 2000: Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Veterinary journal*, 160, 92-106.
- Merchand, J. A., M. J. Colston and R. A. Cox, 1999: Effects of growth conditions on expression of mycobacterial *murA* and *tyrS* genes and contributions of their transcripts to precursor rRNA synthesis. *Journal of bacteriology*, 181, 4617-4627.
- Merkal, R. S., A. W. Lepper, A. M. Hintz and J. L. Riley, 1977: Comparison of techniques for measuring the local and systemic responses to tuberculin in cattle. *American journal of veterinary research*, 38, 113-116.
- Merkal, R. S. and D. L. Whipple, 1980: Inactivation of *Mycobacterium bovis* in meat products. *Applied and environmental microbiology*, 40, 282-284.
- Michel, A. L., 2002: Implications of tuberculosis in African wildlife and livestock. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 251-255.
- Michel, A. L., C. Geoghegan, T. Hlokwé, K. Raseleka, W. M. Getz and T. Marcotty, 2015: Longevity of *Mycobacterium bovis* in raw and traditional souring milk as a function of storage temperature and dose. *PloS one*, 10, e0129926.
- Michel, A. L., B. Muller and P. D. van Helden, 2010: *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Veterinary microbiology*, 140, 371-381.
- Michel, A. L. and M. Simoes, 2009: Comparative field evaluation of two rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 127, 186-189.
- Mignard, S., C. Pichat and G. Carret, 2006: *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerging infectious diseases*, 12, 1431-1433.
- Mijs, W., P. de Haas, R. Rossau, T. Van der Laan, L. Rigouts, F. Portaels and D. van Soolingen, 2002: Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 1505-1518.
- Millington, K. A., S. M. Fortune, J. Low, A. Garces, S. M. Hingley-Wilson, M. Wickremasinghe, O. M. Kon and A. Lalvani, 2011: Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 5730-5735.
- Mitchell, M. A., 2012: Mycobacterial infections in reptiles. *The veterinary clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 15, 101-111, vii.
- Mitchell, R. M., G. F. Medley, M. T. Collins and Y. H. Schukken, 2012: A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiology and infection*, 140, 231-246.
- Mon, M. L., R. D. Moyano, M. N. Viale, M. A. Colombatti Olivieri, I. J. Gamietea, V. N. Montenegro, B. Alonso, L. Santangelo Mde, M. Singh, R. Duran and M. I. Romano, 2014: Evaluation of cocktails with recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. *BioMed research international*, 2014, 140829.
- Monaghan, M. L., M. L. Doherty, J. D. Collins, J. F. Kazda and P. J. Quinn, 1994: The tuberculin test. *Veterinary microbiology*, 40, 111-124.

- Monies, R. J., M. P. Cranwell, N. Palmer, J. Inwald, R. G. Hewinson and B. Rule, 2000: Bovine tuberculosis in domestic cats. *The Veterinary record*, 146, 407-408.
- Monies, R. J. and J. C. Head, 1999: Bovine tuberculosis in housed calves. *The Veterinary record*, 145, 743.
- Monreal, L., D. Segura, J. Segales, J. M. Garrido and M. Prades, 2001: Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in a mare. *The Veterinary record*, 149, 712-714.
- Montali, R. J., S. K. Mikota and L. I. Cheng, 2001: *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Revue scientifique et technique*, 20, 291-303.
- Montoya, D., M. S. Inkeles, P. T. Liu, S. Realegeno, R. M. Teles, P. Vaidya, M. A. Munoz, M. Schenk, W. R. Swindell, R. Chun, K. Zavala, M. Hewison, J. S. Adams, S. Horvath, M. Pellegrini, B. R. Bloom and R. L. Modlin, 2014: IL-32 is a molecular marker of a host defense network in human tuberculosis. *Science translational medicine*, 6, 250ra.
- Moradi, J., N. Mosavari, M. Ebrahimi, R. Arefpajohi and M. Tebianian, 2015: Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* Early Secreted Antigenic Target 6 recombinant protein as a diagnostic marker in skin test. *Osong Public Health Res Perspect*, 6, 34-38.
- More, S. J. and G. McGrath, 2015: Randomised Badger Culling Trial: interpreting the results. *The Veterinary record*, 177, 128-129.
- Morris, R. S., D. U. Pfeiffer and R. Jackson, 1994: The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary microbiology*, 40, 153-177.
- Moser, I., W. M. Prodinger, H. Hotzel, R. Greenwald, K. P. Lyashchenko, D. Bakker, D. Gomis, T. Seidler, C. Ellenberger, U. Hetzel, K. Wuennemann and P. Moisson, 2008: *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Veterinary microbiology*, 127, 399-406.
- Mostowy, S., J. Inwald, S. Gordon, C. Martin, R. Warren, K. Kremer, D. Cousins and M. A. Behr, 2005: Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *Journal of bacteriology*, 187, 6386-6395.
- Muller, B., S. Durr, S. Alonso, J. Hattendorf, C. J. Laisse, S. D. Parsons, P. D. van Helden and J. Zinsstag, 2013: Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging infectious diseases*, 19, 899-908.
- Munroe, F. A., I. R. Dohoo and W. B. McNab, 2000: Estimates of within-herd incidence rates of *Mycobacterium bovis* in Canadian cattle and cervids between 1985 and 1994. *Preventive veterinary medicine*, 45(3-4), 247-256.
- Munroe, F. A., I. R. Dohoo, W. B. McNab and L. Spangler, 1990: Risk factors for the between-herd spread of *Mycobacterium bovis* in Canadian cattle and cervids between 1985 and 1994. *Preventive veterinary medicine*, 41, 119-133.
- Munyeme, M., J. B. Muma, E. Sjkerve, A. M. Nambota, I. G. K. Phiri, K. L. Samui, P. Dorny and M. Tryland, 2008: Risk factors associated with bovine tuberculosis in traditional cattle of the livestock/wildlife interface areas in the Kafue basin of Zambia. *Preventive veterinary medicine*, 85, 317-328.
- Muñoz Mendoza, M., L. Juan, S. Menéndez, A. Ocampo, J. Mourelo, J. L. Sáez, L. Domínguez, C. Gortázar, J. F. García Marín and A. Balseiro, 2012: Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in sheep. *Veterinary journal*, 191, 267-269.
- Murray, E. J., S. S. Murray and S. C. Manolagas, 1990: Two-dimensional gel autoradiographic analyses of the effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on protein synthesis in clonal rat osteosarcoma cells. *Endocrinology*, 126, 2679-2692.
- Murray, P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller and Y. R. H., 2003: *Manual of clinical microbiology*.
- Muskens, J., F. van Zijderveld, A. Eger and D. Bakker, 2002: Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Veterinary microbiology*, 86, 269-278.
- Muyldermans, S., 2001: Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology*, 74, 277-302.
- Myllymäki, H., M. Niskanen, K. E. Oksanen and M. Rämetsä, 2015: Animal models in tuberculosis research - where is the beef? *Expert opinion on drug Discovery*, 10, 871-883.

- Naima, S., M. Borna, M. Bakir, Y. Djamel, B. Fadila, Z. Jakob and G. Djamel, 2011: Tuberculosis in cattle and goats in the north of Algeria. *The Veterinary record*, 4, 100-103.
- Napp, S., A. Allepuz, I. Mercader, M. Nofrarías, S. López-Soria, M. Domingo, B. Romero, J. Bezos and B. Pérez de Val, 2013: Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *The Veterinary record*, 172, 663.
- Naranjo, V., C. Gortázar, J. Vicente and J. de la Fuente, 2008: Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary microbiology*, 127, 1-9.
- Neill, S. D., J. Cassidy, J. Hanna, D. P. Mackie, J. M. Pollock, A. Clements, E. Walton and D. G. Bryson, 1994b: Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary record*, 135, 134-135.
- Neill, S. D., J. Hanna, J. J. O'Brien and R. M. McCracken, 1989: Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *The Veterinary record*, 124, 269-271.
- Neill, S. D., J. J. O'Brien and J. Hanna, 1991: A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Veterinary microbiology*, 28, 103-109.
- Neill, S. D., J. M. Pollock, D. B. Bryson and J. Hanna, 1994a: Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary microbiology*, 40, 41-52.
- Nelson, C. D., T. A. Reinhardt, J. D. Lippolis, R. E. Sacco and B. J. Nonnecke, 2012: Vitamin D signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients*, 4, 181-196.
- Netea, M. G., E. C. Lewis, T. Azam, L. A. Joosten, J. Jaekal, S. Y. Bae, C. A. Dinarello and S. H. Kim, 2008: Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 3515-3520.
- Newport, M., M. Levin, J. Blackwell, M. A. Shaw, R. Williamson and C. Huxley, 1995: Evidence for exclusion of a mutation in NRAMPT as the cause of familial disseminated atypical mycobacterial infection in a Maltese kindred. *Journal of medical genetics*, 32, 904-906.
- Nielsen, S. S. and A. K. Ersbøll, 2006: Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected dairy cows. *Journal of dairy science*, 89, 4557-4566.
- Niemann, S., E. Richter and S. Rusch-Gerdes, 2002: Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52, 433-436.
- Nold, M. F., C. A. Nold-Petry, G. B. Pott, J. A. Zepp, M. T. Saavedra, S. H. Kim and C. A. Dinarello, 2008: Endogenous IL-32 controls cytokine and HIV-1 production. *Journal of Immunology*, 181, 557-565.
- Norby, B., P. C. Bartlett, S. D. Fitzgerald, L. M. Granger, C. S. Bruning-Fann, D. L. Whipple and J. B. Payeur, 2004: The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 16 126-131.
- North, R. J. and Y. J. Jung, 2004: Immunity to tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 22, 599-623.
- Nugent, G., C. Gortázar and G. Knowles, 2015: The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in wild deer and feral pigs and their roles in the establishment and spread of bovine tuberculosis in New Zealand wildlife. *New Zealand veterinary journal*, 1-14.
- O'Brien, D. J., S. M. Schmitt, D. E. Berry, S. D. Fitzgerald, T. J. Lyon, J. R. Vanneste, T. M. Cooley, S. A. Hogle and J. S. Fierke, 2008: Estimating the true prevalence of *Mycobacterium bovis* in free-ranging elk in Michigan. *Journal of wildlife diseases*, 44, 802-810.
- O'Loan, C. J., J. M. Pollock, J. Hanna and S. D. Neill, 1994: Immunoblot analysis of humoral immune responses to *Mycobacterium bovis* in experimentally infected cattle: early recognition of a 26-kilodalton antigen. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 1, 608-611.
- O'Reilly, L. M., 1986: Field trials to determine a suitable injection dose of bovine PPD tuberculin for the diagnosis of bovine

- tuberculosis in naturally infected cattle. *Developments in biological standardization*, 58 (Pt B), 695-703.
- O'Reilly, L. M. and C. J. Daborn, 1995: The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 76 Suppl 1, 1-46.
- O'Keeffe, J. J. and H. O'Driscoll, 1996: Analysis of epidemiology reports on selected herd breakdowns of tuberculosis submitted during 1996-1997. *Tuberculosis Investigation Unit, University College Dublin*, 1-5.
- Oettinger, T., M. Jorgensen, A. Ladefoged, K. Haslov and P. Andersen, 1999: Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 79, 243-250.
- Oevermann, A., G. E. Pfyffer, P. Zanolari, M. Meylan and N. Robert, 2004: Generalized tuberculosis in llamas (*Lama glama*) due to *Mycobacterium microti*. *Journal of clinical microbiology*, 42, 1818-1821.
- OIE, 2008: Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.3.6. Tuberculosis aviar. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.06.%20Tuberculosis%20aviar.pdf.
- OIE, 2009: *Bovine tuberculosis. The tuberculin test. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* 2009. Chapter 2.4.7: Bovine tuberculosis adopted, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf. 6th ed, 7-7.
- Ojo, O., S. Sheehan, G. D. Corcoran, M. Okker, K. Gover, V. Nikolayevsky, T. Brown, J. Dale, S. V. Gordon, F. Drobniowski and M. B. Prentice, 2008: *Mycobacterium bovis* strains causing smear-positive human tuberculosis, Southwest Ireland. *Emerging infectious diseases*, 14, 1931-1934.
- Okafor, C. C., D. L. Grooms, S. R. Bolin, T. D. Gravelyn and J. B. Kaneene, 2013: Effect of transportation, time of sampling, and lymphocyte numbers on gamma interferon response to *Mycobacterium bovis* in cattle at time of slaughter. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 25, 248-253.
- Okafor, C. C., D. L. Grooms, S. R. Bolin and J. B. Kaneene, 2012: Detection of interferon- γ response to tuberculosis in blood collected at commencement of exsanguination at slaughter from cattle sensitized with *Mycobacterium bovis*. *American journal of veterinary research*, 73, 847-853.
- Olea-Popelka, F. J., E. Costello, P. White, G. McGrath, J. D. Collins, J. O'Keeffe, D. F. Kelton, O. Berke, S. More and S. W. Martin, 2008: Risk factors for disclosure of additional tuberculous cattle in attested-clear herds that had one animal with a confirmed lesion of tuberculosis at slaughter during 2003 in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 85, 81-91.
- Olsen, I., R. G. Barletta, C. O. Thoen and P. J. F. Mycobacterium. In: Gyles C L, Songer J G, Thoen C O., 2010: Pathogenesis of bacterial infections in animals., 113-139. 4th Edition Blackwell Publ.
- Olsen, I., P. Boysen, S. Kulberg, J. C. Hope, G. Jungersen and A. K. Storset, 2005: Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infection and immunity*, 44, 5628-5635.
- Omer, M. K., E. Skjerve, Z. Woldehiwet and G. Holstad, 2001: A cross-sectional study of bovine tuberculosis in dairy farms in Asmara, Eritrea. *Tropical animal health and production*, 33, 295-303.
- OMS, 2010: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44286/1/9789241599191_eng.pdf.
- OMS, 2012: http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/BCG_Vaccine_rates_information_sheet_ES.pdf.
- OMS, 2015: Inmunización, Vacunas y Productos Biológicos. <http://www.who.int/immunization/documents/positionpapers/es/>.
- Ong, B. L., Y. F. Ngeow, M. F. Razak, Y. Yakubu, Z. Zakaria, A. R. Mutalib, L. Hassan, H. F. Ng and K. Verasahib, 2013: Tuberculosis in captive Asian elephants (*Elephas*

- maximus*) in Peninsular Malaysia. *Epidemiology and infection*, 141, 1481-1487.
- Ozyigit, M. O., S. Senturk and A. Akkoc, 2007: Suspected congenital generalised tuberculosis in a newborn calf. *The Veterinary record*, 160, 307-308.
- Paixao, T. A., C. Ferreira, A. M. Borges, D. A. Oliveira, A. P. Lage and R. L. Santos, 2006: Frequency of bovine Nramp1 (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109, 37-42.
- Palanisamy, G. S., N. DuTeau, K. D. Eisenach, D. M. Cave, S. A. Theus, B. N. Kreiswirth, R. J. Basaraba and I. M. Orme, 2009: Clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* display a wide range of virulence in guinea pigs. *Tuberculosis*, 89, 203-209.
- Palmer, M. V., 2007a: Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Current topics in microbiology and immunology*, 315, 195-215.
- Palmer, M. V., 2013: *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 1, 1-13.
- Palmer, M. V., T. C. Thacker, W. R. Waters, S. Robbe-Austerman and F. E. Aldwell, 2014: Persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Danish in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) vaccinated with a lipid-formulated oral vaccine. *Transboundary and emerging diseases*, 61, 266-272.
- Palmer, M. V., W. R. Waters and T. C. Thacker, 2007b: Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary pathology*, 44, 863-874.
- Palmer, M. V., W. R. Waters, T. C. Thacker, R. Greenwald, J. Esfandiari and K. P. Lyashchenko, 2006: Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13, 387-394.
- Parra, A., P. Fernandez-Llario, A. Tato, J. Larrasa, A. García, J. M. Alonso, M. Hermoso de Mendoza and J. Hermoso de Mendoza, 2003: Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary microbiology*, 97, 123-133.
- Parra, A., N. García, A. García, A. Lacombe, F. Moreno, F. Freire, J. Morán and J. Hermoso de Mendoza, 2008: Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 127, 315-324.
- Parrish, N. M., J. D. Dick and W. R. Bishai, 1998: Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, 6, 107-112.
- Parsons, S. D., J. A. Drewe, N. C. Gey van Pittius, R. M. Warren and P. D. van Helden, 2013: Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerging infectious diseases*, 19, 2004-2007.
- Parsons, S. D., R. M. Warren, T. H. Ottenhoff, N. C. Gey van Pittius and P. D. van Helden, 2012: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in dogs in a high-risk setting. *Research in veterinary science*, 92, 414-419.
- Pate, M., T. Svara, M. Gombac, T. Paller, M. Zolnir-Dovc, I. Emersic, W. M. Prodinger, M. Bartos, I. Zdovc, B. Krt, I. Pavlik, Z. Cvetnic, M. Pogacnik and M. Ocepek, 2006: Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 53, 387-392.
- Paterson, A. B., 1959: Tuberculosis. *Diseases due to Bacteria*, 2, 671-687.
- Paul, P. S., D. W. Johnson, C. J. Mirocha, F. F. Soper, C. O. Thoen, C. C. Muscoplat and A. F. Weber, 1977: In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: suppression of phytohemagglutinin and specific antigen lymphocyte responses by aflatoxin. *American journal of veterinary research*, 38, 2033-2035.
- Pavlik, I., 2006: The experience of new European Union Member States concerning the control of bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 112, 221-230.
- Pavlik, I., F. Bures, P. Janovsky, P. Pechinka, M. Bartos, L. Dvorska, L. Matlova, K. Kremer and D. van Soolingen, 2002b: The last outbreak of bovine tuberculosis in cattle in the Czech Republic in 1995 was caused by *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae*. *Veterinary medicine (Czech)*, 47, 251-263.
- Pavlik, I., L. Dvorska, M. Bartos, I. Parmova, I. Meliciarek, A. Jesenska, M. Havelkova,

- M. Slosarek, I. Putova, G. Martin, W. Erler, K. Kremer and V. van Soolingen, 2002a: Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965-2001 studied by spoligotyping. *Veterinary medicine (Czech)*, 47, 181-194.
- Pena, J. C. and W. Z. Ho, 2015: Monkey models of tuberculosis: lessons learned. *Infection and immunity*, 83, 852-862.
- Perera, P. Y., J. H. Lichy, T. A. Waldmann and L. P. Perera, 2012: The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 14, 247-261.
- Perez, A. M., M. P. Ward, A. Charmandarian and V. Ritacco, 2002: Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, 54, 361-372.
- Pérez de Val, B., M. Nofrías, S. López-Soria, J. M. Garrido, H. M. Vordermeier, B. Villarreal-Ramos, M. Martin, E. Puentes, R. A. Juste and M. Domingo, 2012: Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC veterinary research*, 8, 191.
- Pérez, E., S. Samper, Y. Bordas, C. Guilhot, B. Gicquel and C. Martín, 2001: An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Molecular microbiology*, 41, 179-187.
- Pesciaroli, M., J. Alvarez, M. B. Boniotti, M. Cagiola, V. Di Marco, C. Marianelli, M. Pacciarini and P. Pasquali, 2014: Tuberculosis in domestic animal species. *Research in veterinary science*, 97 Suppl, S78-85.
- Pieters, J. and J. Gatfield, 2002: Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. *Trends in microbiology*, 10, 142-146.
- Plackett, P., J. Ripper, L. A. Corner, K. Small, W. K. de, L. Melville, S. Hides and P. R. Wood, 1989: An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian veterinary journal*, 66, 15-19.
- Pollock, C., 2012: Mycobacterial infection in the ferret. *The veterinary clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 15, 121-129, vii.
- Pollock, J. M. and P. Andersen, 1997: The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*, 175, 1251-1254.
- Pollock, J. M., R. M. Girvin, K. A. Lightbody, R. A. Clements, S. D. Neill, B. M. Buddle and P. Andersen, 2000: Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *The Veterinary record*, 146, 659-665.
- Pollock, J. M., J. McNair, H. Bassett, J. P. Cassidy, E. Costello, H. Aggerbeck, I. Rosenkrands and P. Andersen, 2003: Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *Journal of clinical microbiology*, 41, 1856-1860.
- Pollock, J. M., J. McNair, M. D. Welsh, R. M. Girvin, H. E. Kennedy, D. P. Mackie and S. D. Neill, 2001: Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81, 103-107.
- Pollock, J. M. and S. D. Neill, 2002: *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary journal*, 163, 115-127.
- Pollock, J. M., J. D. Rodgers, M. D. Welsh and J. McNair, 2006: Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Veterinary microbiology*, 112, 141-150.
- Pollock, J. M., M. D. Welsh and J. McNair, 2005: Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, 108, 37-43.
- Praud, A., M. L. Boschioli, L. Meyer, B. Garin-Bastuji and B. Dufour, 2015: Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. *Epidemiology and infection*, 143, 157-166.
- Pritchard, D. G., 1988: A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *Journal of comparative pathology*, 9, 357-399.
- Proding, W. M., A. Brandstatter, L. Naumann, M. Pacciarini, T. Kubica, M. L. Boschioli, A. Aranaz, G. Nagy, Z. Cvetnic, M. Ocepek, A. Skrypnyk, W. Erler, S. Niemann, I. Pavlik and I. Moser, 2005: Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by

- mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of clinical microbiology*, 43, 4984-4992.
- Prodinger, W. M., A. Eigentler, F. Allerberger, M. Schonbauer and W. Glawischnig, 2002: Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *Journal of clinical microbiology*, 40, 2270-2272.
- Prodinger, W. M., A. Indra, O. K. Koksalan, Z. Kilicaslan and E. Richter, 2014: *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12, 1501-1513.
- Protocolo de utilización e informe de valoración del uso de pistolas de inoculación intradérmica, 2011: https://www.visavet.es/data/libros/Erradicacion_tuberculosis_Protocolo_utilizacion_informe_valoracion_pistolas_intradermica-VISAVET-MARM-2011.pdf.
- Quintas, H., J. Reis, I. Pires and N. Alegria, 2010: Tuberculosis in goats. *The Veterinary record*, 166, 437-438.
- R development core team, 2011: *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing.
- Radunz, B., 2006: Surveillance and risk management during the latter stages of eradication: experiences from Australia. *Veterinary microbiology*, 112, 283-290.
- Radunz, B. L. and A. W. Lepper, 1985: Suppression of skin reactivity to bovine tuberculin in repeat tests. *Australian veterinary journal*, 62, 191-194.
- Ramirez-Villaescusa, A. M., G. F. Medley, S. Mason and L. E. Green, 2009: Herd and individual animal risks associated with bovine tuberculosis skin test positivity in cattle in herds in south west England. *Preventive veterinary medicine*, 92, 188-198.
- Rangen, S. A., O. P. Surujballi, C. Lutze-Wallace and V. W. Lees, 2009: Is the gamma interferon assay in cattle influenced by multiple tuberculin injections? *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 50, 270-274.
- Rastogi, N., E. Legrand and C. Sola, 2001: The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique*, 20, 21-54.
- Ratcliffe, L. T., P. T. Lukey, C. R. MacKenzie and S. R. Ress, 1994: Reduced NK activity correlates with active disease in HIV-patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Clinical and experimental immunology*, 97, 373-379.
- Reavill, D. R. and R. E. Schmidt, 2012: Mycobacterial lesions in fish, amphibians, reptiles, rodents, lagomorphs, and ferrets with reference to animal models. *The veterinary clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 15, 25-40, v.
- Reed, G. B., 1957: Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animal except those causing leprosy). *Williams & Wilkins, Baltimore*.
- Repasy, T., N. Martinez, J. Lee, K. West, W. Li and H. Kornfeld, 2015: Bacillary replication and macrophage necrosis are determinants of neutrophil recruitment in tuberculosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*.
- Reviriego Gordejo, F. J. and J. P. Vermeersch, 2006: Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary microbiology*, 112, 101-109.
- Rhodes, S., T. Holder, D. Clifford, I. Dexter, J. Brewer, N. Smith, L. Waring, T. Crawshaw, S. Gillgan, K. Lyashchenko, J. Lawrence, J. Clarke, R. de la Rua-Domenech and M. Vordermeier, 2012: Evaluation of gamma interferon and antibody tuberculosis tests in alpacas. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 19, 1677-1683.
- Rhodes, S. G., L. A. Terry, J. Hope, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2003: 1,25-dihydroxyvitamin D3 and development of tuberculosis in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10, 1129-1135.
- Riordan, P., R. J. Delahay, C. Cheeseman, P. J. Johnson and D. W. Macdonald, 2011: Culling-induced changes in badger (*Meles meles*) behaviour, social organisation and the epidemiology of bovine tuberculosis. *PloS one*, 6, e28904.
- Ritacco, V., B. López, L. Barrera, A. Nader, E. Fliess and I. N. N de Kantor, 1990: Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of veterinary medicine*, 37, 19-27.
- Ritacco, V., B. Lopez, I. N. De Kantor, L. Barrera, F. Errico and A. Nader, 1991: Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in veterinary science*, 50, 365-367.

- Ritchie, J. N., 1959: Tuberculosis. *Diseases due to bacteria*, 2, 713–744.
- Rittershaus, E. S., S. H. Baek and C. M. Sassetti, 2013: The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe*, 13, 643–651.
- Robinson, R. T., I. M. Orme and A. M. Cooper, 2015: The onset of adaptive immunity in the mouse model of tuberculosis and the factors that compromise its expression. *Immunological Reviews*, 264, 46–59.
- Rodríguez, E., L. P. Sánchez, S. Pérez, L. Herrera, M. S. Jiménez, S. Samper and M. J. Iglesias, 2009: Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 13, 1536–1541.
- Rodríguez, S., J. Bezos, B. Romero, L. de Juan, J. Álvarez, E. Castellanos, N. Moya, F. Lozano, M. T. Javed, J. L. Saéz-Llorente, E. Liébana, A. Mateos, L. Domínguez, A. Aranaz and S. M. o. A. Spanish Network on, Tuberculosis, 2011: *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging infectious diseases*, 17, 532–535.
- Romero, B., A. Aranaz, J. Bezos, J. Álvarez, L. de Juan, M. Tariq Javed, A. Mateos, E. Gómez-Mampaso and L. Domínguez, 2007: Drug susceptibility of Spanish *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals. *Tuberculosis*, 87, 565–571.
- Romero, B., A. Aranaz, L. de Juan, J. Álvarez, J. Bezos, A. Mateos, E. Gómez-Mampaso and L. Domínguez, 2006: Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of clinical microbiology*, 44, 3405–3408.
- Roth, J. A., 1985b: Cortisol as mediator of stress-associated immunosuppression in cattle. 225–243. Publisher Springer New York.
- Roth, J. A. and B. L. Goff, 1989: Immunology and production diseases. 121–130. In: F.A. Kalfelz (ed.): Proceedings, 7th International Conference on Production Disease in Farm. Animals. Cornell University Press, pp 121–130.
- Roth, J. A. and M. L. Kaeberle, 1985a: Enhancement of lymphocyte blastogenesis and neutrophil function by avridine in dexamethasone-treated and nontreated cattle. *American journal of veterinary research*, 46, 53–57.
- Rothel, J. S., S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox and P. R. Wood, 1990: A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian veterinary journal*, 67, 134–137.
- Rothel, J. S., S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox and P. R. Wood, 1992: The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian veterinary journal*, 69, 1–4.
- Rothschild, B. M., L. D. Martin, G. Lev, H. Bercovier, G. K. Bar-Gal, C. Greenblatt, H. Donoghue, M. Spigelman and D. Brittain, 2001: *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33, 305–311.
- Roy, S., P. F. Barmes, A. Garg, S. Wu, D. Cosman and R. Vankayalapati, 2008: NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *The journal of immunology*, 180, 1729–1736.
- Ryan, E., P. Dwyer, D. Connolly, J. Fagan, E. Costello and S. More, 2008: Tuberculosis in alpaca (*Lama pacos*) on a farm in Ireland. 1. A clinical report. *Irish veterinary journal*, 61, 527–531.
- Ryan, T. J., B. M. Buddle and G. W. De Lisle, 2000: An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in veterinary science*, 69, 57–61.
- Ryan, T. J., P. G. Livingstone, D. S. Ramsey, G. W. de Lisle, G. Nugent, D. M. Collins and B. M. Buddle, 2006: Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Veterinary microbiology*, 112, 211–219.
- Sable, S. B., M. Cheruvu, S. Nandakumar, S. Sharma, K. Bandyopadhyay, K. L. Kellar, J. E. Posey, B. B. Plikaytis, R. R. Amara

- and T. M. Shinnick, 2011: Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination. *PLoS one*, 6, e22718.
- Saito, M., W. K. Pan, R. H. Gilman, C. T. Bautista, S. Bamrah, C. A. Martín, S. J. Tsiouris, D. F. Argüello and G. Martínez-Carrasco, 2006: Comparison of altitude effect on *Mycobacterium tuberculosis* infection between rural and urban communities in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75, 49-54.
- Sánchez, J., L. Tomás, N. Ortega, A. J. Buendía, L. del Río, J. Salinas, J. Bezós, M. R. Caro and J. A. Navarro, 2011: Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitary pulmonary tuberculosis in naturally infected goats. *Journal of comparative pathology*, 145, 107-117.
- Santema W, van Kooten P, Hoek A, Leeflang M, Overdijk M, Rutten V and K. A., 2011: Hsp70 vaccination-induced antibodies recognize B cell epitopes in the cell wall of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vaccine*, 29, 1364-1373.
- Sarradell, J. E., J. Alvarez, M. Biscia, M. Zumarraga, A. Wunschmann, A. G. Armien and A. M. Perez, 2015: *Mycobacterium bovis* infection in a horse with granulomatous enterocolitis. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 27, 203-205.
- Satthaporn, S. and O. Eremin, 2001: Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb*, 46, 9-19.
- Scanlon, M. P. and P. J. Quinn, 2000: Inactivation of *Mycobacterium bovis* in cattle slurry by five volatile chemicals. *Journal of applied microbiology*, 89, 854-861.
- Scheerlinck, J. P., 1999: Functional and structural comparison of cytokines in different species. *Veterinary immunology and immunopathology*, 72, 39-44.
- Scheerlinck, J. P. and H. H. Yen, 2005: Veterinary applications of cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 108, 17-22.
- Schiller, I., B. Oesch, H. M. Vordermeier, M. V. Palmer, B. N. Harris, K. A. Orloski, B. M. Buddle, T. C. Thacker, K. P. Lyashchenko and W. R. Waters, 2010b: Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and emerging diseases*, 57, 205-220.
- Schiller, I., H. M. Vordermeier, W. R. Waters, A. Kyburz, M. Cagiola, A. Whelan, M. V. Palmer, T. C. Thacker, J. Meijlis, C. Carter, S. Gordon, T. Egnuni, R. Hardegger, B. Marg-Haufe, A. Raeber and B. Oesch, 2010c: Comparison of tuberculin activity using the interferon-gamma assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *The Veterinary record*, 167, 322-326.
- Schiller, I., W. R. Waters, H. M. Vordermeier, T. Jemmi, M. Welsh, N. Keck, A. Whelan, E. Gormley, M. L. Boschirolti, J. L. Moyon, C. Vela, M. Cagiola, B. M. Buddle, M. Palmer, T. Thacker and B. Oesch, 2011: Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary microbiology*, 151, 153-159.
- Schiller, I., W. R. Waters, H. M. Vordermeier, B. Nonnecke, M. Welsh, N. Keck, A. Whelan, T. Sigafosse, C. Stamm, M. Palmer, T. Thacker, R. Hardegger, B. Marg-Haufe, A. Raeber and B. Oesch, 2009: Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 16, 1196-1202.
- Schmidbauer, S. M., P. Wohlsein, G. Kirpal, A. Beineke, G. Müller, H. Müller, I. Moser and W. Baumgartner, 2007: Outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a wild animal park. *The Veterinary record*, 161, 304-307.
- Schmidt, V., S. Schneider, J. Schlömer, M. E. Krautwald-Junghanns and E. Richter, 2008: Transmission of tuberculosis between men and pet birds: a case report. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.*, 37, 589-592.
- Schmiedel, A., 1966: On the epidemiology of human bovine tuberculosis in an industrial region. *Praxis der Pneumologie*, 20, 271-284.
- Schmiedel, A., 1968: Development and present state of bovine tuberculosis in man. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis*, 40, 5-32.
- Schoepf, K., W. M. Proding, W. Glawischnig, E. Hofer, S. Revilla-Fernandez, J.

- Hofrichter, J. Fritz, J. Köfer and F. Schmoll, 2012: A two-years' survey on the prevalence of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in red deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet Sci*, 2012:245138.
- Schoning, J. M., N. Cerny, S. Prohaska, M. M. Wittenbrink, N. H. Smith, G. Bloemberg, M. Pewsner, I. Schiller, F. C. Origgi and M. P. Ryser-Degiorgis, 2013: Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and Liechtenstein. *PLoS one*, 8, e54253.
- Seibert, F. B. and J. T. Glen, 1941: PPD-S was comprised of approximately 92.1% protein, 5.9% polysaccharides and 1.2% nucleic acid. *American review of tuberculosis*, 44, 9-24.
- Seibert, F. B. and G. T. Glenn, 1941: Tuberculin purified derivative. Preparation and analysis of a large quantity for Standard. *The american review of tuberculosis*, 44, 9-25.
- Semret, M., D. Bakker, N. Smart, I. Olsen, K. Haslov and M. A. Behr, 2006: Genetic analysis of *Mycobacterium avium* complex strains used for producing purified protein derivatives. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 13, 991-996.
- Shanahan, A., M. Good, A. Duignan, T. Curtin and S. J. More, 2011: Tuberculosis in goats on a farm in Ireland: epidemiological investigation and control. *The Veterinary record*, 168, 485.
- Sharpe, A. E., C. P. Brady, A. J. Johnson, W. Byrne, K. Kenny and E. Costello, 2010: Concurrent outbreak of tuberculosis and caseous lymphadenitis in a goat herd. *The Veterinary record*, 166, 591-592.
- Shindarov, L. and S. Todorov, 1962: Intercellular development of *Mycobacterium tuberculosis* (typus humanus) in tissue culture of kidney epithelium of tortoise (*Testudo graeca*). *Comptes rendus de l'Academie Bulgare des sciences: sciences mathematiques et naturelles*, 15, 543-546.
- Shrikrishna, D., R. de la Rua-Domenech, N. H. Smith, A. Colloff and I. Coutts, 2009: Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? *Thorax*, 64, 89-91.
- Shuralev, E., P. Quinn, M. Doyle, A. Duignan, H. F. Kwok, J. Bezos, S. A. Olwill, E. Gormley, A. Aranaz, M. Good, W. C. Davis, J. Clarke and C. Whelan, 2012: Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats. *Veterinary microbiology*, 154, 292-297.
- Sidders, B., C. Pirson, P. J. Hogarth, R. G. Hewinson, N. G. Stoker, H. M. Vordermeier and K. Ewer, 2008: Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection and immunity*, 76, 3932-3939.
- Skuce, R. A., A. R. Allen and S. W. McDowell, 2012: Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. *Veterinary medicine international*, 2012, 621210.
- Skuce, R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. G. Hewinson and S. D. Neill, 2002: Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*, 148, 519-528.
- Smith, N. H., 2012: The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12, 857-865.
- Smith, N. H., S. V. Gordon, R. de la Rua-Domenech, R. S. Clifton-Hadley and R. G. Hewinson, 2006: Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature reviews. Microbiology*, 4, 670-681.
- Smith, N. H. and P. Upton, 2012: Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12, 873-876.
- Snider, D. E. J., 1982: The tuberculin skin test. *The American review of respiratory disease*, 125, 108-118.
- Sorensen, A. L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen and A. B. Andersen, 1995: Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*, 63, 1710-1717.

- Spiegelhalter, D., N. Best, B. P. Carlin and A. Van der Linde, 2002: Bayesian measures of model complexity and fit. *J R Stat Soc: Series B* 64, 583-639.
- Spohr, C., E. Kaufmann, S. Battenfeld, K. Duchow, K. Cussler, E. Balks and M. Bastian, 2015: A new lymphocyte proliferation assay for potency determination of bovine tuberculin PPDs. *ALTEX*.
- Sreevatsan, S., P. Escalante, X. Pan, D. A. Gillies, 2nd, S. Siddiqui, C. N. Khalaf, B. N. Kreiswirth, P. Bifani, L. G. Adams, T. Ficht, V. S. Perumaalla, M. D. Cave, J. D. van Embden and J. M. Musser, 1996: Identification of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for *Mycobacterium bovis*. *Journal of clinical microbiology*, 34, 2007-2010.
- Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam and J. M. Musser, 1997: Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 9869-9874.
- Stabel, J. R., W. R. Waters, J. P. Bannantine and K. Lyashchenko, 2011: Mediation of host immune responses after immunization of neonatal calves with a heat-killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18, 2079-2089.
- Stavri, H., N. Bucurenci, I. Ulea, A. Costache, L. Popa and M. I. Popa, 2012: Use of recombinant purified protein derivative (PPD) antigens as specific skin test for tuberculosis. *Indian journal of medical research* 136, 799-807.
- Stevens, J. B., C. O. Thoen, E. B. Rohonczy, S. Tessaro, H. A. Kelly and J. R. Duncan, 1998: The immunological response of llamas (*Lama glama*) following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Canadian journal of veterinary research*, 62, 102-109.
- Sturtz, S., U. Ligges and A. Gelman, 2005: R2WinBUGS: A Package for Running WinBUGS from R. *Journal of Statistical Software*, 12, 1-16.
- Subbian, S., L. Tsenova, P. O'Brien, G. Yang, N. L. Kushner, S. Parsons, B. Peixoto, D. Fallows and G. Kaplan, 2012: Spontaneous latency in a rabbit model of pulmonary tuberculosis. *The American journal of pathology*, 181, 1711-1724.
- Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel and C. Locht, 2000: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*, 36, 762-771.
- Supply, P., R. M. Warren, A. L. Banuls, S. Lesjean, G. D. Van Der Spuy, L. A. Lewis, M. Tibayrenc, P. D. Van Helden and C. Locht, 2003: Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Molecular microbiology*, 47, 529-538.
- Surcel, H. M., M. Troye-Blomberg, S. Paulie, G. Andersson, C. Moreno, G. Pasvol and J. Ivanyi, 1994: Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology*, 81, 171-176.
- Sutherland, I., C. L. Miller and P. D. Hart, 1964: Further studies of sensitivity to avian and human old tuberculin in man. *Tubercle*, 45, 110-113.
- Swindle, B. C., L. A. Baisden, H. H. Johnson and R. R. Henley, 1950: Studies of tuberculin. I. The comparison of various types of tuberculin tests on reactor cattle., 110-121. Book: Proc. U.S. Livestock sanit Ass. 54th Ann. Meeting.
- Szmaragd, C., L. E. Green, G. F. Medley and W. J. Browne, 2012: Impact of imperfect test sensitivity on determining risk factors: the case of bovine tuberculosis. *PLoS one*, 7, e43116.
- Taffes, K., F. Dawo, T. Sori and G. Ameni, 2011: Prevalence of caprine tuberculosis in Midt-Rift Valley area of Oromia, Ethiopia. *African journal of microbiology research*, 5, 1473-1478.
- Tameni, S., M. Amadori, P. Scaccaglia, R. Quondam-Giandomenico, S. Tagliabue, I. L. Achetti, R. Adone and F. Ciuchini, 1998: Quality controls and in vitro diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculin. *Biologicals*, 26, 225-235.
- Team, R. C., 2014: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Tewari, D., E. Hovingh, R. Linscott, E. Martel, J. Lawrence, D. Wolfgang and D. Griswold, 2014: *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis* antibody response, fecal shedding, and antibody cross-reactivity to *Mycobacterium bovis* in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle herds vaccinated against Johne's disease. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 21, 698-703.
- The Control of Bovine Tuberculosis in Northern Ireland, 2009: http://www.bovinetb.info/docs/Bovine_Final.pdf.
- Thoen, C. O., P. A. Lobue, D. A. Enarson, J. B. Kaneene and I. N. de Kantor, 2009: Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria italiana*, 45, 135-181.
- Thom, M., C. Howard, B. Villarreal-Ramos, E. Mead, M. Vordermeier and J. Hope, 2008: Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 88, 324-334.
- Thom, M., J. H. Morgan, J. C. Hope, B. Villarreal-Ramos, M. Martin and C. J. Howard, 2004: The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 102, 399-412.
- Thom, M. L., M. McAulay, H. M. Vordermeier, D. Clifford, R. G. Hewinson, B. Villarreal-Ramos and J. C. Hope, 2012: Duration of immunity against *Mycobacterium bovis* following neonatal vaccination with bacillus Calmette-Guerin Danish: significant protection against infection at 12, but not 24, months. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19, 1254-1260.
- Thorel, M. F., M. Krichevsky and V. V. Levy-Frebault, 1990: Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 40, 254-260.
- Tomlinson, A. J., M. A. Chambers, R. A. McDonald and R. J. Delahay, 2015: Association of quantitative interferon-gamma responses with the progression of naturally acquired *Mycobacterium bovis* infection in wild European badgers (*Meles meles*). *Immunology*, 144, 263-270.
- Toossi, Z. and J. J. Ellner, 1998: The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clinical immunology and immunopathology*, 87, 107-114.
- Tsairidou, S., J. A. Woolliams, A. R. Allen, R. A. Skuce, S. H. McBride, D. M. Wright, M. L. Bermingham, R. Pong-Wong, O. Matika, S. W. McDowell, E. J. Glass and S. C. Bishop, 2014: Genomic prediction for tuberculosis resistance in dairy cattle. *PloS one*, 9, e96728.
- Tuberculosis Eradication Conference, 1959. U.S. Department of Agriculture, Kansas. Agricultural Research Service.
- Tweddle, N. E. and P. Livingstone, 1994: Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Veterinary microbiology*, 40, 23-39.
- Twomey, D. F., R. Collins, M. P. Cranwell, T. R. Crawshaw, R. J. Higgins, G. S. Dean, H. M. Vordermeier, A. Hollingdale and R. de la Rua-Domenech, 2012: Controlling tuberculosis in a llama (*Lama glama*) herd using clinical signs, tuberculin skin testing and serology. *Veterinary journal*, 192, 246-248.
- Twomey, D. F., T. R. Crawshaw, J. E. Anscombe, J. E. Barnett, L. Farrant, L. J. Evans, W. S. McElligott, R. J. Higgins, G. S. Dean, H. M. Vordermeier and R. de la Rua-Domenech, 2010a: Assessment of antemortem tests used in the control of an outbreak of tuberculosis in llamas (*Lama glama*). *The Veterinary record*, 167, 475-480.
- Twomey, D. F., T. R. Crawshaw, J. E. Anscombe, L. Farrant, L. J. Evans, W. S. McElligott, R. J. Higgins, G. Dean, M. Vordermeier, K. Jahans and R. de la Rua-Domenech, 2007: TB in llamas caused by *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary record*, 160, 170.
- Twomey, D. F., T. R. Crawshaw, A. P. Foster, R. J. Higgins, N. H. Smith, L. Wilson, K. McDean, J. L. Adams and R. de la Rua-Domenech, 2009: Suspected transmission of *Mycobacterium bovis* between alpacas. *The Veterinary record*, 165, 121-122.
- Twomey, D. F., R. J. Higgins, D. R. Worth, M. Okker, K. Gover, E. J. Nabb and G. Speirs, 2010b: Cutaneous TB caused by *Mycobacterium bovis* in a veterinary

- surgeon following exposure to a tuberculous alpaca (*Vicugna pacos*). *The Veterinary record*, 166, 175-177.
- Ulrichs, T. and S. H. Kaufmann, 2003: Immunology of tuberculosis: impact on the development of novel vaccines. *Der Internist (Berl)*, 44, 1374-1384.
- Une, Y. and T. Mori, 2007: Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 30, 415-425.
- United States Department of Agriculture, 2009: A New Approach for Managing Bovine Tuberculosis: Veterinary Services Proposed Action Plan. 1-12.
- Urdahl, K. B., S. Shafiani and J. D. Ernst, 2011: Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunology*, 4, 288-293.
- van Crevel, R., T. H. Ottenhoff and J. W. van der Meer, 2002: Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 15, 294-309.
- van der Geize, R. and L. Dijkhuizen, 2004: Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Current opinion in microbiology*, 7, 255-261.
- van Embden, J. D., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. van Der Zeijst and L. M. Schouls, 2000: Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of bacteriology*, 182, 2393-2401.
- Van Ingen, J., Z. Rahim, A. Mulder, M. J. Boeree, R. Simeone, R. Brosch and D. van Soolingen, 2012: Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases*, 18, 653-655.
- van Pinxteren, L. A., P. Ravn, E. M. Agger, J. Pollock and P. Andersen, 2000: Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7, 155-160.
- van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P. E. de Haas, P. W. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls and J. D. van Embden, 1997: A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 1236-1245.
- Vargas, M. H., M. E. Furuya and C. Perez-Guzman, 2004: Effect of altitude on the frequency of pulmonary tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 8, 1321-1324.
- Veen, J., J. V. Kuyvenhoven, E. T. Dinkla, J. Haagsma and J. H. Nieuwenhuis, 1991: Tuberculosis in alpacas; a zoonosis as an imported disease. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 135, 1127-1130.
- Venteo, A., B. Rebollo, J. Sarraseca, M. J. Rodriguez and A. Sanz, 2012: A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of virological methods*, 181, 109-113.
- Veranus, A. M., 1913: Bovine Tuberculosis and Its Control. Editor Carpenter. New York State Veterinary College at Cornell University.
- Vilaplana, C., O. Gil, N. Caceres, S. Pinto, J. Diaz and P. J. Cardona, 2011: Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against TB based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one*, 6, e20404.
- Viljoen, I. M., P. D. van Helden and R. P. Millar, 2015: *Mycobacterium bovis* infection in the lion (*Panthera leo*): Current knowledge, conundrums and research challenges. *Veterinary microbiology*, 177, 252-260.
- Vordermeier, H. M., J. Brown, P. J. Cockle, W. P. Franken, J. W. Drijfhout, S. M. Arend, T. H. Ottenhoff, K. Jahans and R. G. Hewinson, 2007: Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 14, 1203-1209.
- Vordermeier, H. M., P. J. Cockle, A. O. Whelan, S. Rhodes and R. G. Hewinson, 2000: Toward the development of diagnostic assays to discriminate between *Mycobacterium bovis* infection and bacille Calmette-Guerin vaccination in cattle. *Clinical infectious diseases : an*

- official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30 Suppl 3, S291-298.
- Vordermeier, H. M., M. A. Chambers, B. M. Buddle, J. M. Pollock and R. G. Hewinson, 2006: Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *Veterinary journal*, 171, 229-244.
- Vordermeier, H. M., M. A. Chambers, P. J. Cockle, A. O. Whelan, J. Simmons and R. G. Hewinson, 2002: Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, 70, 3026-3032.
- Vordermeier, H. M., B. Perez de Val, B. M. Buddle, B. Villarreal-Ramos, G. J. Jones, R. G. Hewinson and M. Domingo, 2014: Vaccination of domestic animals against tuberculosis: review of progress and contributions to the field of the TBSTEP project. *Research in veterinary science*, 97 Suppl, S53-60.
- Vordermeier, H. M., A. Whelan, P. J. Cockle, L. Farrant, N. Palmer and R. G. Hewinson, 2001: Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8, 571-578.
- Vordermeier, M., G. Ameni, S. Berg, R. Bishop, B. D. Robertson, A. Aseffa, R. G. Hewinson and D. B. Young, 2012: The influence of cattle breed on susceptibility to bovine tuberculosis in Ethiopia. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35, 227-232.
- Vordermeier, M., S. V. Gordon and A. R. Hewinson, 2009: Antigen mining to define *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected animals: A VLA perspective. *Transboundary and emerging diseases*, 56, 240-247.
- Vordermeier, M., G. J. Jones and A. O. Whelan, 2011: DIVA reagents for bovine tuberculosis vaccines in cattle. *Expert review of vaccines*, 10, 1083-1091.
- Wadhwa, A., R. E. Johanson, K. Eda, W. R. Waters, M. V. Palmer, J. P. Bannantine and S. Eda, 2014: Evaluation of ethanol vortex ELISA for detection of bovine tuberculosis in cattle and deer. *BMC veterinary research*, 10, 147.
- Wagner, J. C., G. Buchanan, V. Bokkenheuser and S. Leviser, 1958: An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature*, 181, 284-285.
- Walter, W. D., C. W. Anderson, R. Smith, M. Vanderklok, J. J. Averill and K. C. Vercauteren, 2012: On-farm mitigation of transmission of tuberculosis from white-tailed deer to cattle: literature review and recommendations. *Veterinary medicine international*, 2012, 616318.
- Wareham, A. S., J. A. Tree, P. D. Marsh, P. D. Butcher, M. Dennis and S. A. Sharpe, 2014: Evidence for a role for interleukin-17, Th17 cells and iron homeostasis in protective immunity against tuberculosis in cynomolgus macaques. *PloS one*, 9, e88149.
- Washko, R. M., H. Hoefer, T. E. Kiehn, D. Armstrong, G. Dorsinville and T. R. Frieden, 1998: *Mycobacterium tuberculosis* infection in a green-winged macaw (*Ara chloroptera*): report with public health implications. *Journal of clinical microbiology*, 36, 1101-1102.
- Waters, W. R., B. M. Buddle, H. M. Vordermeier, E. Gormley, M. V. Palmer, T. C. Thacker, J. P. Bannantine, J. R. Stabel, R. Linscott, E. Martel, F. Milian, W. Foshaug and J. C. Lawrence, 2011a: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 18, 1882-1888.
- Waters, W. R., M. F. Maggioli, J. L. McGill, K. P. Lyashchenko and M. V. Palmer, 2014a: Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. *Veterinary immunology and immunopathology*, 159, 113-132.
- Waters, W. R., B. J. Nonnecke, S. C. Olsen and M. V. Palmer, 2007: Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Veterinary microbiology*, 119, 277-282.
- Waters, W. R., B. J. Nonnecke, T. E. Rahner, M. V. Palmer, D. L. Whipple and R. L. Horst, 2001: Modulation of *Mycobacterium*

- bovis*-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8, 1204-1212.
- Waters, W. R. and M. V. Palmer, 2015b: *Mycobacterium bovis* Infection of Cattle and White-Tailed Deer: Translational Research of Relevance to Human Tuberculosis. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 56, 26-43.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, B. M. Buddle and H. M. Vordermeier, 2012b: Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*, 30, 2611-2622.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, M. R. Stafne, K. E. Bass, M. F. Maggioli, T. C. Thacker, R. Linscott, J. C. Lawrence, J. T. Nelson, J. Esfandiari, R. Greenwald and K. P. Lyashchenko, 2015a: Effects of serial skin testing with purified protein derivative on the level and quality of antibodies to complex and defined antigens in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 22, 641-649.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, T. C. Thacker, J. P. Bannantine, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, R. Greenwald, J. Esfandiari, J. McNair, J. M. Pollock, P. Andersen and K. P. Lyashchenko, 2006b: Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 13, 648-654.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, T. C. Thacker, W. C. Davis, S. Sreevatsan, P. Coussens, K. G. Meade, J. C. Hope and D. M. Estes, 2011b: Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011, 768542.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, T. C. Thacker, J. B. Payeur, N. B. Harris, F. C. Minion, R. Greenwald, J. Esfandiari, P. Andersen, J. McNair, J. M. Pollock and K. P. Lyashchenko, 2006a: Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 13, 611-619.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, D. L. Whipple, M. P. Carlson and B. J. Nonnecke, 2003: Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10, 960-966.
- Waters, W. R., T. C. Thacker, J. T. Nelson, D. M. DiCarlo, M. F. Maggioli, R. Greenwald, J. Esfandiari, K. P. Lyashchenko and M. V. Palmer, 2014b: Virulence of two strains of *mycobacterium bovis* in cattle following aerosol infection. *Journal of comparative pathology*, 151, 410-419.
- Waters, W. R., T. C. Thacker, B. J. Nonnecke, M. V. Palmer, I. Schiller, B. Oesch, H. M. Vordermeier, E. Silva and D. M. Estes, 2012a: Evaluation of gamma interferon (IFN-gamma)-induced protein 10 responses for detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*: comparisons to IFN-gamma responses. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19, 346-351.
- Wedlock, D. N., M. Denis, G. F. Painter, G. D. Ainge, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson and B. M. Buddle, 2008: Enhanced protection against bovine tuberculosis after coadministration of *Mycobacterium bovis* BCG with a Mycobacterial protein vaccine-adjuvant combination but not after coadministration of adjuvant alone. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 15, 765-772.
- Weiner, J. and S. H. Kaufmann, 2014: Recent advances towards tuberculosis control: vaccines and biomarkers. *Journal of Internal Medicine*, 275, 467-480.
- Welsh, M. D., R. T. Cunningham, D. M. Corbett, R. M. Girvin, J. McNair, R. A. Skuce, D. G. Bryson and J. M. Pollock, 2005: Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 114 101-111.
- Wernery, U., J. Kinne, K. L. Jahans, H. M. Vordermeier, J. Esfandiari, R. Greenwald, B. Johnson, A. Ul-Haq and K. P. Lyashchenko, 2007: Tuberculosis outbreak in a dromedary racing herd and rapid serological detection of infected camels. *Veterinary microbiology*, 122, 108-115.
- Whelan, A. O., D. Clifford, B. Upadhyay, E. L. Bredon, J. McNair, G. R. Hewinson and M. H. Vordermeier, 2010a:

- Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *Journal of clinical microbiology*, 48, 3176-3181.
- Whelan, A. O., M. Coad, Z. A. Peck, D. Clifford, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2004: Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *The Veterinary record*, 155, 204-206.
- Whelan, A. O., M. Coad, B. L. Upadhyay, D. J. Clifford, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2011: Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitisation and protective immunity in cattle. *Vaccine*, 29, 5453-5458.
- Whelan, A. O., J. C. Hope, C. J. Howard, D. Clifford, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier, 2003: Modulation of the bovine delayed-type hypersensitivity responses to defined mycobacterial antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *Infection and immunity*, 71, 6420-6425.
- Whelan, C., E. Shuralev, G. O'Keeffe, P. Hyland, H. F. Kwok, P. Snoddy, A. O'Brien, M. Connolly, P. Quinn, M. Groll, T. Watterson, S. Call, K. Kenny, A. Duignan, M. J. Hamilton, B. M. Buddle, J. A. Johnston, W. C. Davis, S. A. Olwill and J. Clarke, 2008: Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 15, 1834-1838.
- Whelan, C., A. O. Whelan, E. Shuralev, H. F. Kwok, G. Hewinson, J. Clarke and H. M. Vordermeier, 2010b: Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 17, 813-817.
- Whipple, D. L., C. A. Bolin and A. J. Davis, 1995: Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial-interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *American journal of veterinary research*, 56, , 415-419.
- Whipple, D. L., C. A. Bolin and J. M. Miller, 1996: Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 8, 351-354.
- Whipple, D. L., M. V. Palmer, R. E. Slaughter and S. L. Jones, 2001: Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 13, 117-122.
- White, P. C. and J. K. Benhin, 2004: Factors influencing the incidence and scale of bovine tuberculosis in cattle in southwest England. *Preventive veterinary medicine*, 63, 1-7.
- WHO, 2012: *Tuberculosis laboratory biosafety manual*, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf.
- Wiker, H. G., 2009: MPB70 and MPB83--major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian journal of immunology*, 69, 492-499.
- Wilkinson D, Bennett R, McFarlane I, Rushton S, Shirley M and S. GC., 2009: Cost-benefit analysis model of badger (*Meles meles*) culling to reduce cattle herd tuberculosis breakdowns in Britain, with particular reference to badger perturbation. *Journal of wildlife diseases*, 45, 1062-1088.
- Wilton, S. and D. Cousins, 1992: Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods and applications*, 1, 269-273.
- Wint, G. R. W., T. P. Robinson, D. M. Bourn, P. A. Durr, S. I. Hay, S. E. Randolph and D. J. Rogers, 2002: Mapping bovine tuberculosis in Great Britain using environmental data. *Trends in microbiology*, 10, 441-444.
- Wobeser, G., 2009: Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 50, 1169-1176.
- Woese, C. R., 1987: Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
- Wolfe, D. M., O. Berke, S. More, D. F. Kelton, P. W. White, J. J. O'Keeffe and S. W. Martin, 2009: The risk of a positive test for bovine tuberculosis in cattle purchased from herds with and without a recent history of bovine tuberculosis in Ireland. *Preventive veterinary medicine*, 92, 99-105.

- Wood, P. R., L. A. Corner and P. Plackett, 1990: Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Research in veterinary science*, 49, 46-49.
- Wood, P. R. and S. L. Jones, 2001: Bovigam™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81, 147-155.
- Wood, P. R. and J. S. Rothel, 1994: In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*, 40, 125-135.
- Woods, R., D. V. Cousins, R. Kirkwood and D. L. Obendorf, 1995: Tuberculosis in a wild Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) from Tasmania. *Journal of wildlife diseases*, 31, 83-86.
- Wright, D. M., A. R. Allen, T. R. Mallon, S. W. McDowell, S. C. Bishop, E. J. Glass, M. L. Bermingham, J. A. Woolliams and R. A. Skuce, 2013: Detectability of bovine TB using the tuberculin skin test does not vary significantly according to pathogen genotype within Northern Ireland. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 19, 15-22.
- Xin, T., H. Jia, J. Ding, P. Li, H. Yang, S. Hou, W. Yuan, X. Guo, H. Wang, Q. Liang, M. Li, B. Wang and H. Zhu, 2013: Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20, 482-490.
- Xu, G., Y. Li, J. Yang, X. Zhou, X. Yin, M. Liu and D. Zhao, 2007: Effect of recombinant Mce4A protein of *Mycobacterium bovis* on expression of TNF- α , iNOS, IL-6, and IL-12 in bovine alveolar macrophages. *Molecular and cellular biochemistry*, 302, 1-7.
- Yang, H., N. A. Kruh-Garcia and K. M. Dobos, 2012: Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS immunology and medical microbiology*, 66, 273-280.
- Yuan, Y., D. D. Crane, R. M. Simpson, Y. Q. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman and C. E. Barry, 3rd, 1998: The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9578-9583.
- Zanardi, G., M. B. Boniotti, A. Gaffuri, B. Casto, M. Zanon and M. L. Pacciarini, 2013: Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. *Research in veterinary science*, 95, 430-433.
- Zarden, C. F., C. D. Marassi, W. Oelemann and W. Lilienbaum, 2013: A complementary diagnosis of naturally occurring tuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Rio de Janeiro using a MPB70-ELISA, Brazil. *Tropical animal health and production*, 45, 1203-1206.
- Zeng, J. C., W. Y. Xiang, D. Z. Lin, J. Zhang, A., , G. B. Liu, B. Kong, Y. C. Gao, Y. Lu, B., , X. J. Wu, L. L. Yi, J. X. Zhong and J. F. Xu, 2015: Elevated HMGB1-related interleukin-6 is associated with dynamic responses of monocytes in patients with active pulmonary tuberculosis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8, 1341-1353.
- Zeng, W., Y. Zhang, X. Zhao, G. Huang, Y. Jiang, H. Dong, X. Li, K. Wan and C. He, 2013: Occurrence of non-tuberculous mycobacteria species in livestock from northern China and first isolation of *Mycobacterium caprae*. *Epidemiology and infection*, 141, 1545-1551.
- Zhu, Z. Y., D. Zhang, H. B. Wang, J. Z. Xiao, Y. F. Qiu, L. Yan, D. Chen, A. G. Liu and X. Yang, 2014: Expression and serological diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 and Rv2626c proteins. *Genetics and molecular research: GMR*, 13, 7398-7406.

ANEXOS

Anexo I. Interpretación de las pruebas diagnósticas de base celular incluidas en los distintos estudios experimentales.

Interpretación de la prueba IDTB de acuerdo con la normativa nacional (Real Decreto 2611/1996) y europea (Directiva Europea 64/432/CEE) realizada en los distintos estudios experimentales de la presente tesis doctoral.

Prueba IDTB simple

A) Interpretación estándar

Reacción negativa: aumento del espesor del pliegue cutáneo inferior o igual a 2 mm, en ausencia de signos clínicos.

Reacción dudosa: aumento del espesor del pliegue cutáneo superior a 2 mm e inferior a 4 mm, en ausencia de signos clínicos.

Reacción positiva: aumento del espesor del pliegue cutáneo igual o superior a 4 mm y/o presencia de signos clínicos.

B) Interpretación severa

Reacción negativa: aumento del espesor del pliegue cutáneo inferior o igual a 2 mm, en ausencia de signos clínicos.

Reacción positiva: aumento del espesor del pliegue cutáneo superior a 2 mm y/o presencia de signos clínicos.

Prueba IDTB comparada

A) Interpretación estándar:

Reacción negativa: diferencia inferior a 1 mm entre el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD bovina menos el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD aviar, en ausencia de signos clínicos.

Reacción dudosa: diferencia igual o superior a 1 mm e igual o inferior a 4 mm entre el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD bovina menos el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD aviar, en ausencia de signos clínicos.

Reacción positiva: diferencia superior a 4 mm entre el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD bovina menos el aumento del

espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD aviar. Es necesario que la reacción en la localización de la PPD bovina sea positiva para considerar un animal reactor a la prueba IDTB comparada.

B) Interpretación severa:

Reacción negativa: diferencia inferior a 1 mm entre el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD bovina menos el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD aviar, en ausencia de signos clínicos.

Reacción positiva: diferencia igual o superior a 1 mm entre el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD bovina menos el aumento del espesor del pliegue cutáneo inoculado con la PPD aviar. Es necesario que la reacción en la localización de la PPD bovina sea positiva para considerar un animal reactor a la prueba IDTB comparada.

Test de detección de IFN- γ

Interpretación del test de detección de IFN- γ de acuerdo con la interpretación recogida en el Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina realizado en los distintos estudios experimentales de la presente tesis doctoral, se consideró un animal positivo cuando:

- La DO PPD bovina (muestra estimulada con PPD bovina) – DO PBS (muestra estimulada con PBS) igual o superior a 0,05 y
- La DO PPD bovina superior a DO PPD aviar (muestra estimulada con PPD aviar).

Anexo II. Lista de abreviaturas

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BCG: bacilo Calmette-Guérin

BVD: diarrea vírica bovina (*bovine virus diarrhea*)

C: citosina

CAM: comunidad de Madrid

CFP-10: *culture filtrate protein 10*

CPA: célula presentadora de antígenos

DIC: *deviance information criterion*

DIVA: *differentiate between Infected and Vaccinated*

DO: densidad óptica

DTH: reacción de hipersensibilidad retardada o de tipo IV (*delayed type hypersensitivity*)

EFSA: *European Food Safety Authority*

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPIs: equipo de protección individual

ESAT-6: *secretory antigenic target-6 kDa*

G: guanina

IC: intervalos de confianza

IDTB: intradermotuberculinización

IFN- γ : interferón-gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IMC: inmunidad mediada por células

IN: intranasal

IQR: rango intercuartil (*Interquartile range*)

IS: estándar internacional (*International Standard*)

IU: unidades internacionales (*International Units*)

MAC: complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*)

MAPIA: *Multi-Antigen Print Immunoassay*

MOTT: *mycobacteria other than tuberculosis*

MPB83: *mobility protein of M. bovis 83*

MTBC: complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*)

mycoDB: base de datos Nacional de Micobacteriosis Animal

NK: célula asesina natural (*natural killer cell*)

Nramp1: proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural (*natural resistance-associated macrophage protein 1*)

NTM: *non-tuberculous mycobacteria*

OD: *odds ratio*

OIE: Organización Mundial de la Sanidad Animal (*Office International des Epizooties*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTF: oficialmente indemne de tuberculosis (*officially tuberculosis free*)

PA: prevalencia aparente

PBMC: células mononucleadas de la sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PPD: derivado proteico purificado (*purified protein derivative*)

POPR: probabilidad Bayesiana posterior (*Bayesian posterior probability*)

PWM: *pokeweed mitogen*

Q: cuartil

RDs: regiones de diferencia (*regions of difference*)

RLUs: unidades de luminosidad relativa (*relative light units*)

RT: *rapid test*

RT-PCR: PCR a tiempo real (*real time-PCR*)

SC: subcutánea

SD: desviación estándar (*standard deviation*)

SNP: *single nucleotide polymorphism*

S/P: muestra/positiva (*sample/positive*)

Tc: Linfocito T citotóxico

TGF: factor de crecimiento transformante (*transforming growth factor*)

Th: linfocito T colaborador (*Th helper*)

TNF: factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)

UFC: unidad formadora de colonias

UT: unidades tuberculínicas

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WHO: *World Health Organisation*

Anexo III. Lista de figuras

- Figura 1.** Proporción de explotaciones infectadas con *M. bovis* sobre el total de países calificados OTF de la Unión Europea (línea azul), sobre aquellos en los que no se ha erradicado la infección (línea roja) y sobre todos los países miembros (línea verde) durante el 2009 y el 2013. Fuente: EFSA, 2015.....Pag. 20
- Figura 2.** Situación de la tuberculosis bovina a nivel Europeo en el año 2013. Fuente: EFSA, 2015.....Pag. 20
- Figura 3.** Complejo primario completo en ganado bovino. Se observan lesiones en el linfonodo mediastínico y en el pulmónPag. 25
- Figura 4.** Tuberculosis perlada (nódulos multifocales caseificados de tamaño variable) en la pleura visceral de un bovino.....Pag. 25
- Figura 5.** Realización de la IDTB cervical. Medición del espesor del pliegue cutáneo (imagen izquierda), inoculación intradérmica de la PPD bovina (imagen derecha).....Pag. 52
- Figura 6.** Realización de la IDTB en la base del pliegue caudal. Medición del espesor del pliegue cutáneo (imagen izquierda), inoculación intradérmica de la PPD bovina (imagen derecha).....Pag. 53
- Figura 7.** Sistemas de inoculación intradérmica de las PPDs empleados en España para la realización de la prueba de la IDTB. Dermojet (imagen izquierda) y McIntock (imagen derecha).....Pag. 53
- Figura 8.** Localización idónea para realizar la prueba intradérmica en la región cervical anterior en ganado bovino.....Pag. 56
- Figura 9.** Tinción de micobacterias sobre una extensión de muestra de tejido pulmonar empleando el colorante específico auramina.....Pag. 74
- Figura 10.** Granuloma tuberculoso pulmonar. Entre la capa de células epitelioides y linfocitaria se aprecia la presencia de células gigantes multinucleadas de distribución periférica (células de Langhans).....Pag. 76
- Figura 11.** Medios de cultivo sólidos con crecimiento compatible con micobacteria.....Pag. 77
- Figura 12.** Sistema *BACTECTM MGIT™* 960 (*Becton Dickinson, USA*) empleado para la incubación de micobacterias en medio de cultivo líquido.....Pag. 77
- Figura 13.** Inoculaciones realizadas para estudiar el efecto de la posición de la inoculación de la PPD bovina en la IDTB: 1 y 5 zona cervical anterior; 2 y 6 zona cervical posterior; 3 y 7 zona pre-escapular; 4 y 8 zona escapular. L: Lado izquierdo (*left*), R: Lado derecho (*right*). Imagen publicada por Casal *et al.*, 2015 (Anexo VI).....Pag. 114
- Figura 14.** Incremento en la sensibilidad media obtenido en la prueba IDTB al combinar distintos puntos (desde uno hasta ocho) en los que se realizó la IDTB, independientemente de la localización sobre 209 animales infectados.....Pag.122

Figura 15. Sensibilidad relativa sobre los animales procedentes de explotaciones infectadas en los que se confirmó la infección (Figura 15A), especificidad sobre los animales procedentes de explotaciones OTF calificadas (Figura 15B), y la semisuma (Figura 15C) en función del valor establecido para el punto de corte A ($DO_{PPDb_{DO}} - DO_{PBS_{DO}}$) y el punto de corte B ($DO_{PPDb_{DO}} - DO_{PPDa_{DO}}$).....Pag. 133 - 134

Figura 16. Valores de DO obtenidos al estimular las muestras del primer panel con PBS, PPD aviar y PPD bovina al realizar el ELISA con el kit Bovigam (azul), kit B (morado) y con el kit C (verde). Las cajas representan la mediana y el IQR (mínimo-máximo), los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.....Pag. 145

Figura 17. Valores de DO obtenidos al estimular las muestras del tercer panel con PBS, PPD aviar y PPD bovina al realizar el ELISA con el kit Bovigam (azul), y con el kit C (verde). Las cajas representan la mediana y el IQR (mínimo-máximo), los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.....Pag. 145

Figura 18. Valores de DO obtenidos al estimular las muestras del segundo panel con PBS, PPD aviar y PPD bovina al realizar el ELISA con el kit Bovigam (azul) y con el kit C (verde), en el grupo 1 ($n=37$, $DO < 0,05$), grupo 2 ($n=73$, $0,05 < DO < 0,1$), grupo 3 ($n=58$, $0,1 < DO < 0,5$) y grupo 4 ($n=56$, $DO > 0,5$) respectivamente. Las cajas representan la mediana y el IQR (mínimo-máximo), los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.....Pag. 146

Figura 19. Porcentaje de reactores obtenidos en el test de detección de IFN- γ realizado con las PPDs en todos los grupos incluidos en el presente trabajo. Punto de corte 0,05 (Figura 19A) y punto de corte 0,1 (Figura 19B).....Pag. 155

Figura 20. Realización de la infección experimental en ganado caprino. Preparación y desinfección de la zona (imagen izquierda), administración del inóculo (imagen derecha).....Pag. 162

Figura 21. Valores de DO obtenidos en el test de detección de IFN- γ estimulado con la PPD bovina realizado durante todo el estudio en los tres grupos infectados experimentalmente: (grupo 1) *M. bovis*; (grupo 2) *M. caprae*; (grupo 3) *M. tuberculosis*Pag. 168

Figura 22. Localizaciones seleccionadas para realizar la prueba IDTB en el presente estudio: axilar (imagen superior izquierda), pre-escapular (imagen superior derecha) y cervical (imagen inferior).....Pag. 174

Figura 23. Valores de DO (450 nm) del DR-ELISA en el primer muestreo con los animales infectados ($n=16$). Suero obtenido pre-IDTB ($n=16$), 15d post-IDTB ($n=9$) y 42d post-IDTB ($n=7$). La línea de puntos representa el punto de corte (0,35). Los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.....Pag. 182

Figura 24. Valores de DO (450 nm) del DR-ELISA en el segundo muestreo con los animales infectados ($n=39$). Suero obtenido pre-IDTB y 30d post-IDTB ($n=39$). La línea de puntos representa el punto de corte (0,35). Los asteriscos indican la presencia de valores extremos mientras que los círculos indican valores atípicos.Pag. 183

Figura 25. Valores de DO (450 nm) obtenidos con el DR-ELISA en la explotación 1 (Figura 25A, $n=120$) y la explotación 2 (Figura 25B, $n=40$). Suero obtenido pre-IDTB y 120h post-IDTB. Las líneas discontinuas representan los dos puntos de corte evaluados (0,30 y 0,40).....Pag. 190

Anexo IV. Lista de tablas

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Tabla 1. Especies incluidas en el MTBC y su principal hospedador..... | Pag. 5 |
| Tabla 2. Características de las explotaciones calificadas OTF e infectadas de forma natural incluidas en el primer estudio experimental | Pag. 113 |
| Tabla 3. Número y porcentaje de reactores obtenido en cada posición (1-4 lado izquierdo, 5-8 lado derecho); media y desviación estándar (<i>standard deviation</i> : SD) obtenidos en los animales procedentes de explotaciones infectadas (n=818)..... | Pag. 119 |
| Tabla 4. Estimación del efecto de la posición en la probabilidad de obtener una respuesta positiva a la IDTB en 817 animales procedentes de explotaciones infectadas de forma natural. Se consideró la posición 1 (zona cervical anterior del lado izquierdo) como la categoría de referencia..... | Pag. 120 |
| Tabla 5. Sensibilidad media obtenida en todas las posibles combinaciones de entre 1 y 8 respuestas obtenidas y sobre el total de animales en los que se confirmó la infección (n=209)..... | Pag. 121 |
| Tabla 6. Criterios empleados en la interpretación del test de detección de IFN- γ para la realización del segundo estudio experimental..... | Pag. 126 |
| Tabla 7. Reactores y especificidad obtenidos con las muestras procedentes de las explotaciones calificadas OTF empleando los criterios C1, C2 y C3 en el test de detección de IFN- γ | Pag. 128 |
| Tabla 8. Porcentaje de reactores (IC 95%) obtenidos en las muestras procedentes de explotaciones infectadas con los criterios empleados para la interpretación del test de detección de IFN- γ | Pag. 129 |
| Tabla 9. Concordancia (estadístico kappa) obtenida al comparar los resultados del test de detección de IFN- γ con las muestras procedentes de explotaciones infectadas (1, n=66.410), y sobre las muestras de los animales infectados (2, n=919) con los distintos puntos de corte evaluados..... | Pag. 130 |
| Tabla 10. Resultados obtenidos en los animales con infección confirmada de Castilla y León y la CAM empleando el C1, C2 y C3 en la interpretación del test de detección de IFN- γ | Pag. 131 |
| Tabla 11. Probabilidad estimada, IC 95% y P-valores de los <i>odds ratios</i> (OR) ajustados para los animales infectados (n=598) procedentes de Castilla y León detectados por el C1 y clasificados como negativos por el C2 y el C3 sobre, empleando un modelo multivariable mixto de regresión logística..... | Pag. 132 |
| Tabla 12. Número de muestras y momento de recogida de las mismas, explotaciones seleccionadas, rango de animales incluidos en cada una (mínimo y máximo), prevalencia de tuberculosis y número de animales sacrificados/con infección confirmada. | Pag. 136 |
| Tabla 13. Segundo panel de muestras seleccionadas (n=224). Los grupos se establecieron en función del valor de DO obtenido previamente con el kit Bovigam..... | Pag. 137 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Tabla 14. Diferencias en los protocolos e interpretación de los resultados de los tres kits para la detección de IFN- γ | Pag. 138 |
| Tabla 15. Reactores obtenidos sobre el total de animales analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección (T+/C+) del primer panel de muestras..... | Pag. 141 |
| Tabla 16. Reactores (R) obtenidos sobre el total de analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección (T+/C+) en el segundo panel (grupos 1, 2 y 3) del tercer estudio experimental. Las muestras se clasificaron en función del valor de DO obtenido en el ELISA realizado con el kit Bovigam..... | Pag. 142 |
| Tabla 17. Reactores obtenidos sobre el total de animales analizados y sobre aquellos en los que se confirmó la infección (T+/C+) incluidos en el tercer panel de muestras..... | Pag. 144 |
| Tabla 18. Número de reactores y especificidad obtenidos al realizar la IDTB simple y comparada con las PPDs y los cócteles antigénicos STR1 y STR2, 11 y 22 semanas post-vacunación en los cuatro grupos (G1 control, G2 vacuna BCG, G3 vacuna SO2 vía IN y G4 vacuna SO2 vía SC). Para el análisis de los resultados se empleó la interpretación estándar de la IDTB (simple y comparada)..... | Pag. 154 |
| Tabla 19. Número de reactores detectado y especificidad (E) obtenida con el test de detección de IFN- γ estimulando las muestras con el cóctel ESAT-6/CFP-10 y el antígeno Rv3615c durante 22 semanas, empleando el punto de corte de 0,05 y 0,1 en todos los grupos (G1 control, G2 vacuna BCG, G3 vacuna SO2 vía IN y G4 vacuna SO2 vía SC) | Pag.157 |
| Tabla 20. Modelo semi-cuantitativo seguido para clasificar las lesiones observadas en distintos órganos y linfonodos (Vordermeier <i>et al.</i> , 2002)..... | Pag. 164 |
| Tabla 21. Resultados de la IDTB simple y comparada realizada con las PPDs aviar, bovina y humana (interpretación severa), realizada cinco semanas post-infección. Grupo 1: <i>M. bovis</i> , grupo 2: <i>M. caprae</i> , grupo 3: <i>M. tuberculosis</i> , media/mediana (mm)..... | Pag. 165 |
| Tabla 22. Resultados obtenidos en el test de detección de IFN- γ estimulando las muestras con la PPD bovina (PPD-b) o con la PPD humana (PPD-h). Grupo 1: <i>M. bovis</i> , Grupo 2: <i>M. caprae</i> , Grupo 3: <i>M. tuberculosis</i> | Pag. 167 |
| Tabla 23. Cuadro de lesiones observado en los tres grupos experimentales incluidos, en todas las regiones anatómicas y en la cavidad torácica (media \pm error estándar: EE) y resultados del cultivo microbiológico en los tres grupos incluidos..... | Pag. 168 |
| Tabla 24. Animales incluidos y pruebas diagnósticas realizadas en cada uno de los muestreos. En el primero (enero), la IDTB se realizó en la localización axilar, en el segundo (marzo) en localización axilar y la pre-escapular y en el último (junio) se incluyó también la zona cervical. En cada muestreo la interpretación de la IDTB se realizó 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs | Pag. 173 |
| Tabla 25. Proporción de reactores y valor T+/C+ obtenidos empleando la IDTB en la localización axilar con la lectura realizada a 72 y 120 horas en el primer muestreo..... | Pag. 177 |
| Tabla 26. Proporción de reactores y valor T+/C+ obtenidos empleando la IDTB en distintas localizaciones (axilar y pre-escapular) y con la lectura realizada a las 72 y 120 horas en el segundo muestreo | Pag. 178 |

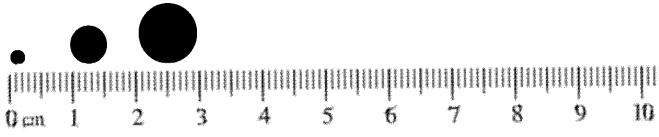
Tabla 27. Proporción de reactores y valor T+/C+ obtenidos empleando la IDTB en distintas localizaciones (axilar, pre-escapular y cervical) y con la lectura efectuada a 72 y 120 horas en el tercer muestreoPag. 180

Tabla 28. Resultados obtenidos en los tres muestreos incluidos en el presente estudio empleando la IDTB simple (interpretación severa) en distintas localizaciones y con la lectura efectuada a 72 y 120 horas, y el DR-ELISA realizado con muestras obtenidas pre y post-IDTB en paralelo.....Pag. 181

Tabla 29. Reactores (R) detectados y especificidad (E) obtenida empleando la IDTB simple y comparada en las dos explotaciones, efectuada en distintas localizaciones y con la lectura realizada 72 y 120 horas tras la inoculación de las PPDs (2.500 IU).....Pag. 188

Tabla 30. Reactores detectados (R) y especificidad (E) obtenida con el DR-ELISA realizado con muestras obtenidas pre y 120 horas post-IDTB (simple y comparada), empleando dos diluciones (1:25 y 1:50).....Pag. 189

Anexo V. Escala para la valoración del cuadro de lesiones (quinto estudio experimental)

| HOJA DE NECROPSIA TUBERCULOSIS | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-----------|
| FECHA RECOGIDA: | CROTAL: | REFERENCIA: | ANALISTA: |
| ASPECTO EXTERNO/ESTADO DE CARNES: | | | |
| <p>CAVIDAD TORACICA:</p> <p>Pulmón:</p> <p>0: sin lesiones; 1: pequeña lesión visible al corte; 2: <5 lesiones <10mm; 3: >6 lesiones <10mm ó 1 lesión grande de > 10 mm; 4: > 1 lesión grande >10mm; 5: grandes lesiones fusionadas.</p> <p><input type="checkbox"/> Izquierdo: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Derecho: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/></p> <p>Otras observaciones:</p> <p>Linfonodos:</p> <p>0: sin necrosis o lesiones visibles; 1: pequeños focos de 1-2 mm; 2: numerosos focos pequeños o lesiones necróticas de al menos 5x5mm; 3: necrosis amplia.</p> <p><input type="checkbox"/> Parotídeo: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Submandibular: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Retrofaríngeo: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Mediastínico: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Traqueobronquial: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Mamario: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Preescapular: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <div style="text-align: center;">  <p>0 cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</p> </div> <p>Otras observaciones:</p> | | | |
| <p>CAVIDAD ABDOMINAL:</p> <p>Válvula ileocecal:</p> <p>0: sin lesiones aparentes; 1: válvula congestiva y/o engrosada; 2: pequeños abscesos; 3: numerosos abscesos pequeños; 4: uno o varios abscesos de gran tamaño.</p> <p><input type="checkbox"/> Válvula: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p> <p>Otras observaciones:</p> <p>Linfonodo ileocecal y linfonodos mesentéricos:</p> <p>0: sin necrosis o lesiones visibles; 1: pequeños focos de 1-2 mm; 2: numerosos focos pequeños o lesiones necróticas de al menos 5x5mm; 3: necrosis amplia.</p> <p><input type="checkbox"/> Linfonodo ileocecal: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Linfonodo mesentérico: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> | | | |
| <p><input type="checkbox"/> Bazo: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/></p> <p>Otras observaciones:</p> | | | |

Anexo VI. Artículos científicos derivados del trabajo realizado para la presente tesis doctoral

Fruto de los estudios desarrollados para realizar la presente tesis doctoral, se han publicado los siguientes trabajos:

Artículos científicos internacionales:

- Bezos J., **Casal C.**, Álvarez J., Díez-Guerrier A., Rodríguez-Bertos A., Romero B., Rueda P., López L., Domínguez L., de Juan L., 2013. *Evaluation of the performance of cellular and serological diagnostic tests for the diagnosis of tuberculosis in an alpaca (Vicugna pacos) herd naturally infected with Mycobacterium bovis*. Prev. Vet. Med. 111(3-4):304-13. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.05.013.
- Bezos J., Romero B., Delgado A., Álvarez J., **Casal C.**, Venteo A., González I., Domínguez L., de Juan L., 2014. *Evaluation of the specificity of intradermal tuberculin and serological tests for diagnosis of tuberculosis in alpaca (Vicugna pacos) and llama (Lama glama) herds under field conditions in Peru*. Vet. Rec. 174(21):532. doi: 10.1136/vr.102463.
- Bezos J., **Casal C.**, Romero B., Schroeder B., Hardegger R., Raeber A.J., López L., Rueda P., Domínguez L., 2014. *Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis*. Res. Vet. Sci. 97 Suppl: S44-52. doi:10.1016/j.rvsc.2014.04.002.
- **Casal C.**, Álvarez J., Bezos J., Quick H., Díez-Guerrier A., Romero B., Sáez J.L., Liandris E., Navarro A., Perez A., Domínguez L., de Juan L., 2015. *Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds*. Prev. Vet. Med. 121(1-2):86-92. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.07.001.
- Bezos J., **Casal C.**, Díez-Delgado I., Romero B., Liandris E., Álvarez J., Sevilla I.A., Juan Ld., Domínguez L., Gortázar C., 2015. *Goats challenged with different members of the Mycobacterium tuberculosis complex display different clinical pictures*. Vet. Immunol. Immunopathol. 167(3-4):185-9. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.07.009.
- Bezos J., **Casal C.**, Jones G., Vordermeier M., Puentes E., Romero B., Liandris E., de Juan L., Martín C., Domínguez L., 2105. *Evaluation of the interference caused by M. tuberculosis SO2 vaccination with the diagnosis of tuberculosis*. In press.

Y además, se encuentran en fase de preparación manuscritos sobre los siguientes estudios:

- *Effect of the diagnostic threshold on the accuracy of the interferon-gamma detection assay for diagnosis of bovine tuberculosis.*
- *Assessment of different commercial IFN-gamma detection assays for diagnosis of bovine tuberculosis.*
- *The increase on the sensitivity of the single intradermal tuberculin test depending on the number of inoculations of bovine PPD.*

Artículos científicos nacionales:

- Álvarez J., Bezos J., **Casal C.**, Boadella M., de Juan L. Micobacteriosis en el porcino: Importancia y pautas para su diagnóstico, identificación y control. *Cría y Salud*, 35: 40-45. 2011.
- Bezos J., **Casal C.**, Fernández de Mera I., Mateos A. La respuesta inmunitaria frente a la tuberculosis en rumiantes domésticos. *Albéitar España*, enero/febrero 2012 N°152. *Albéitar Portugal*, marzo/abril 2012 N° 2.
- Bezos J., de Juan L., Romero B., **Casal C.**, Álvarez J., Domínguez L. Tuberculosis caprina. *Tierras Caprino*, ISSN G-1889-0903, N°. 4, 2013, págs. 58-62.
- Bezos J., Casal C., Romero B., Álvarez J., de Juan L. y Domínguez L. Fundamento inmunológico de las pruebas diagnósticas ante mortem de la tuberculosis. *Albéitar*, 169: 24-25, Asís. 2013.

Póster en congresos:

- Bezos J., **Casal C.**, Álvarez J., Alende T., Viñolo C., Sáez, J.L., Domínguez L., de Juan L. *Diagnosis of tuberculosis in New World Camelids infected by Mycobacterium bovis*. VI *M. bovis* Conference. Organizado por el *Animal Health and Veterinary Laboratories Agency*, *British Cattle Veterinary Association* y el *Department for Environment, Food & Rural Affairs*. Cardiff (Gales, Reino Unido), 16-19 de junio de 2014.
- Bezos J., **Casal C.**, Gareth J., Vordermeier M., Álvarez J., Liandris E., Moya N., Alende T., Gutiérrez A., de Juan L., Domínguez L. *DIVA test performance in goats vaccinated with the Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain SO2*. VI *M. bovis* Conference. Organizado por el *Animal Health and Veterinary Laboratories Agency*, *British Cattle Veterinary Association* y el *Department for Environment, Food & Rural Affairs*. Cardiff (Gales, Reino Unido), 16-19 de junio de 2014.
- **Casal C.**, Romero B., Bezos J., Álvarez J., de la Cruz M.L., Viñolo C., Moya N., Sáez J.L., Domínguez L., de Juan, L. *Assessment of different commercial IFN-gamma detection assays for diagnosis of bovine tuberculosis*. VI *M. bovis* Conference. Organizado por el *Animal Health and Veterinary Laboratories Agency*, *British Cattle Veterinary Association* y el *Department for Environment, Food & Rural Affairs*. Cardiff (Gales, Reino Unido), 16-19 de junio de 2014.
- **Casal C.**, Romero B., Bezos J., Álvarez J., Sáez J.L., Sánchez N., Gutiérrez A., Viñolo C., Allende T., Domínguez L., de Juan L. *Intradermal skin test: a never ending story*. *Society for Applied Microbiology Conference 2014 Med-Vet-Net Association*. Brighton (Reino Unido), 30 de junio- 3 de julio de 2014.

Ponencias en congresos:

- **Casal C.**, Bezos J., Díez-Guerrier A., Álvarez J., Romero B., de Juan L., Rodríguez-Campos S., Fernández-de Mera I.G., Vordermeier M., Whelan A., Hewinson G., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. *Factors affecting intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis*. 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. Brasov (Rumanía), 1-4 de julio de 2012.

-
- de Juan L., Álvarez J., **Casal C.**, Bezos J., Romero B., Díez-Guerrier A., Rodríguez A., Rodríguez-Campos S., Fernández-de Mera I.G., Alende T., Domínguez L. *Diagnosis of tuberculosis in alpacas (Vicugna pacos). First Mycobacterium bovis America Regional Conference*. Mérida (Méjico), 19-22 de agosto de 2012.
 - Álvarez J., de la Cruz M.L., Pérez A., Marqués S., Pagés E., **Casal C.**, Soriano Y., Grau A., Díaz R., Mínguez O., Domínguez L. *Impact of the threshold on the performance of the Interferon-Gamma detection assay for diagnosis of bovine tuberculosis*. 117th Annual Meeting USAHA and 56th Annual Conference AAVLD, San Diego (USA), 17-23 de octubre de 2013.

Carmen Casal Comendador nació en Vigo en 1984. Licenciada en Veterinaria en 2008 por la Universidad de León, Erasmus en la Universidad de Liège (2005-2006). En 2010 inicia su periodo pre-doctoral en la Universidad Complutense de Madrid, trabajando en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) en el Servicio de Micobacterias. Participa activamente en las tareas desarrolladas por el Laboratorio de Referencia Europeo para la Tuberculosis Bovina. Sus líneas de investigación son principalmente el desarrollo y la puesta a punto de técnicas de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* para la detección de la tuberculosis bovina y su aplicación en otras especies animales, con especial atención a la interfaz humano-animal. Además de evaluar el cuadro de lesiones desarrollado por distintas especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en animales domésticos (rumiantes y camélidos) y animales de experimentación (cobayas).



La tuberculosis se supone casi tan antigua como la humanidad y a pesar de todos los esfuerzos realizados contra la lucha de esta zoonosis, está distribuida a nivel mundial. Es una enfermedad que implica consecuencias para la Salud Pública debido al porcentaje de casos de tuberculosis humana con origen animal y para la Sanidad Animal, ya que produce un descenso de la producción, restricciones en el movimiento de los animales, además de importantes costes económicos. La presente tesis doctoral pretende optimizar el rendimiento de las pruebas oficiales para el diagnóstico de la tuberculosis en rumiantes (ganado bovino y caprino) y en camélidos (llamas y alpacas), así como abordar el desarrollo de protocolos alternativos basados en la modificación de las pruebas oficiales actualmente en uso.

Madrid, 2015